

# From the INTERNATIONAL BUREAU

## **PCT**

### **NOTIFICATION OF ELECTION**

(PCT Rule 61.2)

. .

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24

Arlington, VA 22202

Date of mailing (day/month/year)

05 April 2001 (05.04.01)

ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

International application No.
PCT/DE00/01863
International filing date (day/month/year)

Priority date (day/month/year) 07 June 1999 (07.06.99)

Applicant's or agent's file reference

**DV-001 PCT** 

**Applicant** 

SCHATZ, Octavian

07 June 2000 (07.06.00)

1.	The designated Office is hereby notified of its election made:
	X in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
	08 January 2001 (08.01.01)
	in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:
2.	The election X was
	was not
	made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 Form PCT/IB/331 (July 1992)

The International Bureau of WIPO

34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Authorized officer

Antonia Muller

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

	From the INTERNATIONAL BUREAU			
PCT	To:			
NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE  (PCT Rule 92bis.1 and Administrative Instructions, Section 422)  Date of mailing (day/month/year) 05 July 2001 (05.07.01)	Bohi Soni 8033	IMANN, Armin, K. mann & Loosen nenstr. 8 I1 München EMAGNE		
	<u> </u>			
Applicant's or agent's file reference S 10002 PCT		IMPORTANT NOT	TIFICATION	
International application No. PCT/DE00/01863	l	nal filing date (day/month/) une 2000 (07.06.00)	vear)	
The following indications appeared on record concerning:      X the applicant the inventor  Name and Address	the ager	the comm	on representative	
DIAVIR GMBH		DE	DE	
Steinbergstr. 30 D-85250 Altomünster Germany		Telephone No.	<u> </u>	
- Community		Facsimile No.		
		Teleprinter No.		
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that t	he following	change has been recorded	concerning:	
the person X the name the add	dress	the nationality	the residence	
Name and Address		State of Nationality	State of Residence	
SLONING BIOTECHNOLOGY GMBH Steinbergstr. 30		DE	DE	
D-85250 Altomünster Germany		Telephone No.		
		Facsimile No.		
		Teleprinter No.	<del></del>	
3. Further observations, if necessary:				
3. Future observations, it necessary.				
4. A copy of this notification has been sent to:				
X the receiving Office	ſ	the designated Offices	concerned	
X the International Searching Authority	Ī	the elected Offices cor	cerned	
the International Preliminary Examining Authority		other:		
The bound of the Country of the Coun	Authorized	officer		
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland		Margret Fou	rne-Godbersen	
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone	No.: (41-22) 338.83.38		



	From the INTERNATIONAL BUREAU			
PCT	То:			
NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE  (PCT Rule 92bis.1 and Administrative Instructions, Section 422)  Date of mailing (day/month/year) 05 July 2001 (05.07.01)	BOHMANN, Armin, K. Bohmann & Loosen Sonnenstr. 8 80331 München ALLEMAGNE			
Applicant's or agent's file reference S 10002 PCT	IMPORTANT NOTIFICATION			
International application No. PCT/DE00/01863	International filing date (day/month/year) 07 June 2000 (07.06.00)			
1. The following indications appeared on record concerning: the applicant the inventor	the agent the common representative			
Name and Address BETTENHAUSEN, Berthold	State of Nationality State of Residence			
Müllerstrasse 1 D-80469 München Germany	Telephone No. 49(89) 2388 526 Facsimile No.			
	49(89) 2388 5270 Teleprinter No.			
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that t  X the person X the name X the add				
Name and Address BOHMANN, Armin, K.	State of Nationality State of Residence			
Bohmann & Loosen Sonnenstr. 8 80331 München	Telephone No. 49(89) 51 55 64 0			
Germany	Facsimile No. 49(89) 51 55 64 13			
	Teleprinter No.			
Further observations, if necessary:     Please also note the new file reference as indicated as indicate	ted above.			
4. A copy of this notification has been sent to:	the designated Offices conserred			
the International Searching Authority	the designated Offices concerned  X the elected Offices concerned			
X the International Preliminary Examining Authority	X other: Bettenhausen, Berthold			
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer  Margret Fourne-Godbersen			
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38			

•	From th	ne INTER	HMANU	MALOOSEN
PCT	To:			
NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE  (PCT Rule 92bis.1 and Administrative Instructions, Section 422)	Bohi Soni 8033	MANN, AFRICATION OF THE PROPERTY OF THE PROPER	<b>j</b> . in, K.	uli 2001
Date of mailing (day/month/year) 05 July 2001 (05.07.01)				
Applicant's or agent's file reference S 10002 PCT		IMPORTA	ANT NOTI	FICATION
International application No. PCT/DE00/01863		nal filing date (d une 2000 (07	•	ar)
The following indications appeared on record concerning:      X the applicant the inventor	the ager	ıt 🔲	the commo	n representative
Name and Address		State of Natio DE	nality	State of Residence DE
DIAVIR GMBH Steinbergstr. 30 D-85250 Altomünster		Telephone No	·	DE
D-85250 Altomünster Germany				
		Facsimile No.		
	·	Teleprinter No	).	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the	ne following	change has bee	en recorded c	oncerning:
the person X the name the add	ress	the nationa	ality	the residence
Name and Address		State of Natio DE	nality	State of Residence DE
SLONING BIOTECHNOLOGY GMBH Steinbergstr. 30 D-85250 Altomünster		Telephone No	) <u>.                                    </u>	DL .
Germany		Facsimile No.		
		Teleprinter No	).	
3. Further observations, if necessary:	•		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	***
4. A copy of this notification has been sent to:				
X the receiving Office	[	the designa	ated Offices o	concerned
X the International Searching Authority	Į	=	l Offices cond	erned
the International Preliminary Examining Authority		other:		
The Int mati nal Bureau of WIPO 34, chemin des Col mbettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized		rgret Four	ne-Godbersen
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone	No.: (41-22) 338	3.83.38 /	111

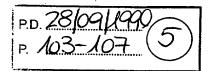


# XP-000941757

103

**GENE 03699** 

### **Short Communications**



A totally synthetic plasmid for general cloning, gene expression and mutagenesis in Escherichia coli

(Recombinant DNA; oligodeoxyribonucleotide; gene synthesis;  $\beta$ -lactamase; DNA replication; transcription terminator)

Wlodek Mandecki, Mark A. Hayden\*, Mary Ann Shallcross and Elizabeth Stotland\*

Corporate Molecular Biology, Abbott Laboratories. Abbott Park, IL 60064 (U.S.A.)

Received by F. Barany: 11 May 1989

Revised: 8 June 1990 Accepted: 11 June 1990

#### SUMMARY

A first totally synthetic *Escherichia coli* plasmid has been designed, constructed and shown to be a functional, stable, high-copy cloning vector. The *FokI* method of gene synthesis [Mandecki and Bolling, Gene 68 (1988) 101–107] was used to assemble the plasmid from 30 oligodeoxyribonucleotides. The plasmid contains synthetic modules for the  $\beta$ -lactamase-encoding gene (bla), replication origin, lacZ gene fragment and multicloning site. The plasmid is patterned after the pUC-type plasmids and has a copy number similar to that of pUC plasmids. The major changes introduced include the removal of nearly 50% of the restriction sites present in pUC plasmids, reduction of plasmid size to 2050 bp, and introduction of transcription terminators downstream from both the bla gene and lacZ fragment. The changes facilitate a number of techniques, such as cloning, mutagenesis, expression and restriction analysis.

#### INTRODUCTION

Two types of plasmids, pBR322 (Bolivar et al., 1977a) and pUC-type vectors (Vieira and Messing, 1982) and their derivatives, constitute a large fraction of vectors currently used for cloning. These vectors are spliced versions of plasmids that exist in nature. Therefore, their sequences have not been optimized (or optimized to a minimal degree) for features desirable in a recombinant DNA vector. Desirable characteristics, which might provide an added

convenience to DNA manipulations, include the smallest vector  $M_r$  possible, the absence/presence of certain type of restriction sites, the means to control the transcription processes, and others. Not every feature (e.g., single-strand ori) was incorporated as to keep a low  $M_r$ , but such module could easily be added to MCS.

Recent progress in molecular biology techniques enables construction of not only synthetic genes, but also of whole replicons. Synthetic plasmids or vectors can be custom-designed to suit the needs of a particular cloning or delivery method. This paper presents the construction of a family of totally synthetic plasmids, designed to aid general DNA cloning, mutagenesis and gene expression projects.

Correspondence to: Dr. W. Mandecki, Corporate Molecular Biology D93D, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL 60064 (U.S.A.) Tel. (708)937-2236; Fax (708)688-6046.

Abbreviations: aa, amino acid(s); Ap, ampicillin; bp, base pair(s); bla, gene encoding  $\beta$ -lactamase; MCS, multicloning site; nt, nucleotide(s); oligo, oligodeoxyribonucleotide; on, origin of DNA replication.

# EXPERIMENTAL AND DISCUSSION

## (a) Design of the plasmid

The overall design of the synthetic plasmid of E. coli was dictated by a set of desirable traits needed in a cloning/expression vector. One requirement was a low  $M_r$  of the

<sup>\*</sup> Present addresses: (M.A.H.) Department of Cellular and Molecular Biology, Northwestern University, Evanston, IL 60201 (U.S.A.) Tel. (708)491-2987; (E.S.) New Graduate College, Princeton University, Princeton, NJ 08544 (U.S.A.) Tel. (609)258-3000.

vector which would facilitate manipulations and purification of restriction fragments derived from it. Another favorable characteristic was the exclusion of as many restriction sites as possible, while introducing unique restriction sites at critical locations. Past experience has shown that subsequent subcloning of a DNA fragment entails a distinct disadvantage when cloning into a vector with many diverse restriction sites.

The synthetic plasmid was divided into three separate cassettes. First, the origin of replication from pUC9 (Vieira

-35 laco NaeI BanI GAATTGATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGC<u>TTTACA</u>CTTTATGCTGCCGGCTCG<u>TATGTT</u>GTGTGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCT<u>ATG</u>ACTATGATT 130 Smal ACGCCC MCS GGGCTTGCCGTCGTTTTACAGCGACGAGACTGGGAAAATCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCCGCACACCCCCCTTTCGCCAGTTGGCGTAATAGCGAAGAAGCCCGCACCGA 255 trpA term. SoeI 385 CATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATTGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCCCACCCCAGAA 515 ACGCTCGTGAAAGTAAAAGACGCAGAGGACCAATTGGGGGCACGAGTGGGATACATAGAACTGGACTTGAATAGCGGTAAAATCCTTGAGAGTTTTCGCCCTGAAGAGCGTTTTCCAATGATGAGCACTT TCAAAGTTCTGCTATGTGGAGCAGTATTATCCCGTGTAGATGCGGGGCAAGAGCAACTCGGACGACGACTACCCCTATTCGCAGAATGACTTGGTTGAATACTCCCCAGTGACAGAAAAGCACCTTACGGA 775 905 CTTCACGGCAACAATTAATAGACTGGCTTGAAGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTACTGCGTTCGGCACTTCCTGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGGGCAGGAGAGCGTGGTTCACGGGGTAT -35 - 10 RNATI **AsrII** 1425 -35 -10 RNAI **RNAI** term CGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACCTTCAA4-;1555 GAACTETGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCG GGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACACCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGCCGGACAGGTATCCGG TAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGGGGGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGG RNase H 1993 GCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCT

Fig. 1. Sequence of the synthetic plasmid. For pWM528 (which corresponds to pUC18), MCS = EcoRI SstI KpnI Smal BamHI XbaI Sall PstI SphI HindIII

GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTT.

For pWM529 (which corresponds to pUC19), MCS = HindIII SphI PstI Sall XbaI BamHI Smal KpnI SstI EcoRI

AAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATGC; pWM521 lacks the MCS. Transcription terminators (term.), -35 and -10 promoter regions, and fMet-encoding ATG triplets are underlined. Translational stop codons are underlined by dashes. Tails of horizontal arrows indicate tsp. A vertical heavy arrow indicates the RNaseH cleavage site (Bolivar et al., 1977b). Apostrophes indicate the division points and give the sequences of FokI fragments. The sequences of synthetic oligos were: arm 1 + sequence between division points + overlap of four 3' terminal residues + arm 2 (Mandecki and Bolling, 1988). The FokI fragments, and oligos, are numbered as indicated above the sequence. As shown, fragment 1 is composed of two discontinuous sequences. Arrowheads define the lacZ cassette. All oligos were synthesized on an Applied Biosystems 380A synthesizer using 5'-dimethoxytrityl nucleoside  $\beta$ -cyanoethyl phosphoramidites. Syntheses were carried out on a 0.2 µM scale controlled pore-glass solid support with an average pore size of 1000 Å. Oligos were purified by gel electrophoresis. Cloning of the synthetic oligos was accomplished by the bridge mutagenesis protocol (Mandecki, 1986). All four cloning vectors (pWM500, pWM501, pWM502, pWM507) used for the FokI method of gene synthesis were cut with SmaI. Approximately 50 ng linearized vector was mixed with 20 pmol of oligo in 30 μl of denaturation buffer (10 mM KCl/5 mM Tris · HCl pH 8.0/5 mM Mg SO<sub>4</sub>/0.5 mM dithiothreitol) and heated at 100°C for 3 min in a boiling water bath. The samples were cooled to room temperature for 5 min and transferred to 200 µl chilled competent JM83 cells (ara, \( \Delta(lac-proAB \)), strA, thi (φ80lacZΔ M15)). Competent cells were prepared by the CaCl<sub>2</sub> procedure. The DNA/cell mixture was chilled on ice for 5 min followed by a 3-min heat shock at 37°C. Approximately 2 ml of Luria-Bertani medium was added to the transformation mix, cells were incubated at 37°C for 1 h, and then plated. The types of cloning vectors used were as follows: pWM500 for fragments 2-14 and 26-29; pWM501-1 for 15-18, 24 and 25; pWM502 for 19-23, and pWM507 for fragment 30. Plasmid constructs containing the FokI fragments for the synthetic plasmid were digested as follows. Approximately 200 ng of each plasmid was cut with 90 units FokI (New England BioLabs). Reactions were carried out in 500 µl volumes containing 1 x FokI buffer (20 mM KCl/10 mM Tris · HCl pH 7.5/10 mM MgCl<sub>2</sub>/10 mM 2-mercaptoethanol) at 37°C for 2.5 h. The insert-containing FokI fragments were then purified by 8% polyacrylamide gel electrophoresis. All 25 FokI fragments (100 ng each) were joined together in a single ligation reaction according to a standard protocol (Mandecki and Bolling, 1988). DNA sequencing revealed an inadvertent sequence change in the ori region of the final constructs compared to the pUC sequence, namely AT (in pUC) → TA (in pWM521) at nt 1765 and 1766 of pWM521.

and Messing, 1982; and a correction from Minton et al., 1988) was chosen. The sequence contains both the RNA I and RNA II replication primer regions along with their respective promoters (Polisky, 1986; Muesing et al., 1981; Cesareni, 1982).

Second, the bla gene of the pUC plasmids was chosen as a selection marker. The gene included the natural P3 promoter (Brosius et al., 1982) found in pUC9 and the strong phage fd gene VIII transcription terminator (Beck et al., 1978). In contrast to the ori region, the nt sequence for bla was changed to remove several restriction sites. In most cases (except  $Ile^{82} \rightarrow Val$ , and  $Val^{182} \rightarrow Ala$ ) the aa sequence was maintained. Approximately 60% of the naturally occurring restriction sites were removed. Preferred E. coli codons were used (Guoy and Gauthier, 1982).

In addition to having an ori region and bla gene, the  $\alpha$ -complementing lacZ gene fragment of pUC was also desirable because of its usefulness as a cloning marker. The lacZ nt sequence (but not the aa sequence) from pUC9 was changed to reduce the number of restriction sites in an analogous way to the bla gene. The SmaI site was maintained as a unique restriction site for the insertion of any other desired site(s).

## (b) Genetic constructions

A total of 25 oligos were synthesized in the first stage of plasmid engineering. The constructions employed the FokI method of gene synthesis (Mandecki and Bolling, 1988). The oligos were cloned into the pWM 500 series of plasmids, purified and sequence verified prior to excision of the individual fragments by cutting with Fok I. All 25 fragments (ranging in size from 40-82 bp) contained unique complementary 4-bp overhangs which, when annealed and ligated, formed a complete closed circular vector. The fragments were ligated together and transformed into SCS-1-competent cells  $[F^-, recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, (r_K^-, recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, (r_K^-, recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, recA1, endA1, en$  $m_K^+$  ), sup E44, relA 1,  $\lambda^-$  ]. Transformed cells were plated on LB plates containing Ap (100  $\mu$ g/ml). Successfully transformed cells could only survive and form colonies if they carried the intact plasmid containing a functional origin of replication and bla gene.

In the second stage of plasmid constructions, the synthetic lacZ cassette (Yanisch-Perron et al., 1985) was cloned into the EcoRI site of the newly constructed plasmid using FokI fragments indicated in Fig. 1. The cassette comprised the lac promoter, the lacZ gene fragment encoding 60 N-terminal aa of  $\beta$ -galactosidase, the trpA transcription terminator (Christie et al., 1981), and SmaI site for the introduction of an MCS site by bridge mutagenesis (Mandecki, 1986). The unique FokI site located in the bla gene was then removed by bridge mutagenesis to allow the use of the synthetic plasmid as a cloning vector for the FokI method of gene synthesis. The mutation caused no ob-

servable change in Ap resistance (data not shown).

Furthermore, a unique NaeI site was introduced into the spacer region of the lacZp promoter to enable to alter its length, and thereby regulate promoter strength using bridge mutagenesis (Mandecki and Reznikoff, 1982; Stefano and Gralla, 1982; Mandecki et al., 1985; Auble and deHaseth, 1988). This new synthetic plasmid construct was designated pWM521. Bridge mutagenesis was then used to clone the MCS from M13mp18 and M13mp19 (Yanisch-Perron et al., 1985) into the SmaI site within the lacZ gene. This was done to accommodate standard cloning protocols established for pUC18 and pUC19. The constructs containing the M13mp18 and M13mp19 MCS were named pWM528 and pWM529, respectively. The nt sequence of plasmid pWM521 is given in Fig. 1, and the list of restriction sites is presented in Table I.

# (c) Characterization of the plasmid

Characterization of the synthetic plasmid was of interest since the plasmid constitutes the first totally synthetic replicon. It is significantly different from its prototype, the pUC-type plasmid. The synthetic plasmid, when compared to pUC-type plasmids, contains three deletions, the total length of which is 636 bp, as well as 70 point mutations. Nearly 50% of the restriction sites present in the pUC plasmids were removed. In particular, the pWM528 plasmid contains only seven sites (including three sites incorporated by design to facilitate manipulations) for restriction enzymes recognizing 6-bp nondegenerate sequences, while there are 24 such sites in the pUC plasmid, not including the MCS. The low number of such sites allows for the use of virtually any six-cutter for cloning, or mutagenesis of cloned genes by restriction fragment replacement with synthetic DNA or bridge mutagenesis. Plasmid pWM521 does not have cleavage sites for 75 restriction enzymes (Table I). The synthetic plasmid is missing the P1 promoter for the blagene (Brosius et al., 1982). It contains the minimum-length ori, two newly introduced transcription terminators and the minimum-length engineered lacZp promoter.

It was shown that the plasmid can be stably propagated for at least 120 generations (four passages on plates supplemented with  $100~\mu g$  Ap/ml). Thus the constructed fragment containing the *ori* region (nt 1349–1993 in Fig. 1) is fully capable of sustaining stable replication. The plasmid copy number was evaluated by scanning the density of plasmid DNA bands on a 1% agarose gel, measuring the yield of DNA from large DNA preparations and by assaying levels of  $\beta$ -lactamase (Jones et al., 1982). The copy number was found to be equivalent to that of pUC9, i.e., 500-700 copies per host (Minton et al., 1988). The plasmids express the lacZ gene fragment, resulting (in a proper host strain) in blue colonies on solid medium supplemented with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside. The plasmids

TABLE I Restriction sites in plasmid pWM521

Enzyme <sup>a</sup>	Cut site	;				
Alu <b>I</b>	22	117	1461	1718	1764	1854
AlwNI	1609					
ApaLI	1704					
AsuI	543	862	1084	1180	1344	
AvaI	135					
AvaII	543	862	1084	1180	1344	
BbvI	45	1390	1596	1599	1689	
Bcefi	130	1057	1519			
BinI	1372	1374	1460			
Bsm AI	162	389	898	964		
BspHI	386	222	601	761	1020	106
BsrI	171	223	581 1616	751	1020	1063
Cault	1491 136	1603 137	1616 1641			
CauII Cfr10I	61	137	1041			
CviJI	22	44	65	117	140	246
CMJI	310	327	946	1036	1062	111:
	1194	1276	1316	1328	1461	1490
	1533	1544	1609	1688	1713	1718
	1764	1854	1952	1978		
Dde <b>I</b>	1744					
DpnI	1360	1368	1379	1454		
Eco31I	893					
Eco 57I	638	1476				
<i>Eco</i> RII	39	176	1857	1870		
Fin I	1791					
Fnu4HI	59	205	482	806	833	98
	1172	1404	1610	1613	1678	182
	1976					
FnuDII	1394	1975				
Hael	1544					
HaeII	1778					
HaeIII	1544	1978				
Hgal	544	1906				
HgiAI	643	1708				
<i>Hgi</i> CI	34					
HgiEII	1430	1502	1677	1777	1844	
Hhal Hinfl	1394 1648	1503	1677	1777	1844	
HpaII	62	136	1450	1640	1666	181
Hph I	499	. 150	1430	1040	1000	101
Ksp632I	427	614				
Mael	304	1525				
MaeIII	182	753	906	1482	1598	166
MboI	. 1358	1366	1377	1452		
MboII	252	444	631	1361		
MfeI	546					
MmeI	1625	1809				
Mnll	533	1591	1840	1915		
MseI	9	193	299	335	874	101
	1051	1286	1310			
Nael	63					
NlaIII	390	907				
NlaIV	36	929	1317	1327	1951	199
NspBII	1435	1680				
PleI	1642					
	1344					
RsrII ScrFI	41	136	137	178	1641	185

TABLE I (continued)

Restriction sites in plasmid pWM521

Enzyme <sup>a</sup>	Cut site	:				
SduI	558	643	1708			
SecI	39	135	1858	•		
SfaNI	675	1921				
SmaI	137					
Spel	303					
SspI	421					
TaqI	1920					
TaqllA	524	879	1361			
Tsp45I	753					
TspEI	2	81	98	336	547	793
-	871	1048	1307			
Tth 111II	1395	1427	1434			
Vsp I	9	1051				
XhoII	1366	1377		•		

<sup>a</sup> Restriction enzymes used for analysis are as compiled in the Intelligenetics Sequence Analysis System, Version 5.3, January 1989. The Prototypes subset, which does not contain isoschizomers, was used. No restriction sites are present in pWM521 for the following enzymes:

AatII	AccI	Acyl
AflII	Afī III	AhaIII
ApaĬ	AsuII	AvaIII
AvrII	Ball	BamHI
BbvII	BclI	BglI
BglII	BsePI	BsmI
<b>BspMI</b>	Bsp MII	<b>BstEII</b>
BstXI	CfrI	ClaI
DraII	DraIII	Dsal
Eco47III	EcoNI	EcoRI
EcoRV	EspI	Fok I
GdiII	Gsul	HgiIII
<i>Hind</i> II	<i>Hind</i> III	Hpal
KpnI	MaeII	Mlu1
MstI	NarI	Ncol
NdeI	NheI	NotI
NruI	Nspl	PfIMI
PmaCI	<i>Ppu</i> MI	PstI
PvuI	PvuII	Rsal
SacI	SacII	SalI
SauI	ScaI	-SfiI
SnaBI	SnaI	SphI
SplI	StuI	StyI
TaqIIB	Tth 111I	Xbal
XhoI	XmaIII	XmnI

have been used for cloning of a variety of genes (data not shown). Lower-copy-number plasmids (150 copies per host) are also available.

## (d) Conclusions

While maintaining the desirable features of the pUC plasmids, the pWM series of synthetic plasmids provide replicons of smaller size, fewer restriction sites and cassette-type organization. Thus, the synthetic plasmid is a very

flexible and efficient vector for general cloning purposes, mutagenesis and expression.

Rapid accumulation of DNA sequencing data together with an improvement in understanding the structure and function of biomolecules and the development of methods for designing novel biomolecules create a need for the synthesis/assembly of increasingly longer DNA molecules. This study has demonstrated that the FokI method, which provides for the accurate construction of large DNA fragments in one ligation, is very well suited for that purpose.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Michael Dabrowski for technical assistance, Tom Kavanaugh for oligo synthesis, Dave Backer for DNA sequencing, Tim Bolling, Michael Klass and Owen McCall for reading the manuscript, and Sue Hopkins for editing.

The plasmid vectors described in this paper are available upon request from the authors.

#### REFERENCES

- Auble, D.T. and deHaseth, P.L.: Promoter recognition by Escherichia coli RNA polymerase. Influence of DNA structure in the spacer separating the -10 and -35 regions. J. Mol. Biol. 202 (1988) 471-482.
- Beck, E., Sommer, R., Auerswald, E.A., Kurz, Ch., Osteburg, G., Schaller, H., Sugimoto, K., Sugisaki, H., Okamoto, T. and Takanami, M.: Nucleotide sequence of bacteriophage fd DNA. Nucleic Acids Res. 5 (1978) 4494-4510.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H. and Falkow, S.: Construction and characterization of new cloning vehicles, II. A multipurpose cloning system. Gene 2 (1977a) 95-113.
- Bolivar, F., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Shine, J., Rodriguez, R.L. and Boyer, H.W.: Origin of replication of pBR345 plasmid DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977b) 5265-5369.
- Brosius, J., Cate, R.L. and Perlmutter, A.P.: Precise location of two

- promoters for the  $\beta$ -lactamase gene of pBR322. J. Biol. Chem. 257 (1982) 9205-9210.
- Cesareni, G.: The RNA primer promoter, as defined in vitro, is essential for pMB1 plasmid replication in vivo. J. Mol. Biol. 160 (1982) 123-126.
- Christie, G.C., Farnham, P.J. and Platt, T.: Synthetic sites for transcription termination and a functional comparison with tryptophan operon termination sites in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981) 4180-4184.
- Guoy, M. and Gautier, C.: Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity. Nucleic Acids Res. 10 (1982) 7055-7074.
- Jones, R.N., Wilson, H.W. and Novick, W.J.: In vitro evaluation of pyridine-2-azo-p-dimethylaniline cephalosporin, a new diagnostic chromogenic reagent, and comparison with nitrocefin, cephacetrile, and other betalactam compounds. J. Clin. Microbiol. 15 (1982) 677-683.
- Mandecki, W.: Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of *Escherichia coli*: a method for site-directed mutagenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 7177-7181.
- Mandecki, W. and Bolling, T.J.: FokI method of gene synthesis. Gene 68 (1988) 101-107.
- Mandecki, W. and Reznikoff, W.S.: A *lac* promoter with a changed distance between -10 and -35 region. Nucleic Acids Res. 10 (1982) 903-912.
- Mandecki, W., Goldman, R.A., Powell, B.S. and Caruthers, M.H.: lac up-promoter mutants with increased homology to the consensus promoter sequence. J. Bacteriol. 164 (1985) 1353-1355.
- Minton, N.P., Chambers, S.P., Prior, S.E., Cole, S.T. and Garnier, T.: Copy number and mobilization properties of pUC plasmid. Focus 10 (1988) 56.
- Muesing, M., Tamm, J., Shepard, H.M. and Polisky, B.: Single base-pair alteration is responsible for the DNA overproduction phenotype of a plasmid copy-number mutant. Cell 24 (1981) 235-242.
- Polisky, B.: Replication control of the ColE1-type plasmids. In: Reznikoff, W.S. (Ed.), Maximizing Gene Expression, Butterworth, Boston, 1986, pp. 143-170.
- Stefano, J.E. and Gralla, J.D.: Spacer mutations in the lacPs promoter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 1069-1072.
- Vieira, J. and Messing, J.: The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 19 (1982) 259-268.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J.: Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33 (1985) 103-119.

			<b>«</b>
·			
	·		

# **PCT**

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts  DV-001 PCT	Reche	Mitteilung über die Übermittlung des internationalen erchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit end, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
207/25 20/21262	(Tag/Monat/Jahr)	07/06/1999
PCT/DE 00/01863	07/06/2000	07/00/1999
Anmelder		
DIAVIR GMBH et al.		
Dieser internationale Recherchenbericht wur Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Ir	de von der Internationalen Reche ternationalen Büro übermittelt.	erchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß
Dieser internationale Recherchenbericht umf  X  Darüber hinaus liegt ihm je	aßt insgesamt <u>3</u> weils eine Kopie der in diesem B	Blätter. ericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.
Grundlage des Berichts		
<ul> <li>a. Hinsichtlich der Sprache ist die inte durchgeführt worden, in der sie ein</li> </ul>	ernationale Recherche auf der G gereicht wurde, sofern unter dies	rundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache sem Punkt nichts anderes angegeben ist.
Anmeldung (Regel 23.1 b)	durchgeführt worden.	ei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen
<ul> <li>b. Hinsichtlich der in der international Recherche auf der Grundlage des</li> </ul>	en Anmeldung offenbarten <b>Nucl</b> e	eotid- und/oder Aminosāuresequenz ist die internationale
	eldung in Schriflicher Form entha	
<b>i</b> —		esbarer Form eingereicht worden ist.
l <u></u> ⊟	ch in schriftlicher Form eingereic	
	ch in computerlesbarer Form ein	
Die Erklärung, daß das na internationalen Anmeldung	chträglich eingereichte schriftlich im Anmeldezeitpunkt hinausgeh	e Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der nt, wurde vorgelegt.
Die Erklärung, daß die in d wurde vorgelegt.	omputerlesbarer Form erfaßten	Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen,
2. Bestimmte Ansprüche h	aben sich als nicht recherchier	bar erwiesen (siehe Feld I).
3. MangeInde Einheitlichke	it der Erfindung (siehe Feld II).	
4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erf	ndung	
, <del>L</del>	ngereichte Wortlaut genehmigt.	
wurde der Wortlaut von de	r Behörde wie folgt festgesetzt:	
5. Hinsichtlich der <b>Zusammenfassung</b>		
	ngereichte Wortlaut genehmigt.	
wurde der Wortlaut nach E	Regel 38.2b) in der in Feld III ang de innerhalb eines Monats nach	gegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der dem Datum der Absendung dieses internationalen
6. Folgende Abbildung der <b>Zeichnunge</b>	n ist mit der Zusammenfassung z	zu veröffentlichen: Abb. Nr
wie vom Anmelder vorges	chlagen	keine der Abb.
weil der Anmelder selbst I	keine Abbildung vorgeschlagen h	at.
weil diese Abbildung die E	rfindung besser kennzeichnet.	

	***	

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum Internationales Büro



# 

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum 14. Dezember 2000 (14.12.2000)

PCT

## (10) Internationale Veröffentlichungsnummer WO 00/75368 A2

(51) Internationale Patentklassifikation7: C12N 15/10, A61K 48/00

C12Q 1/68,

(74) Anwälte: BETTENHAUSEN, Berthold usw.; Müllerstrasse 1, D-80469 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE00/01863

(81) Bestimmungsstaaten (national): DE, JP, US.

(22) Internationales Anmeldedatum:

7. Juni 2000 (07.06.2000)

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(25) Einreichungssprache:

Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache:

(30) Angaben zur Priorität:

Deutsch

Veröffentlicht:

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

199 25 862.7 (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme

7. Juni 1999 (07.06.1999)

von US): DIAVIR GMBH [DE/DE]; Steinbergstr. 30, D-85250 Altomünster (DE).

DE

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHATZ, Octavian [DE/DE]; Steinbergstr. 30, D-85250 Altomünster (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR THE SYNTHESIS OF DNA FRAGMENTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR SYNTHESE VON DNA-FRAGMENTEN

(57) Abstract: The invention relates to a method that can be carried out in parallel and automated for the production of any nucleic acid, comprising the following steps: a) coupling an oligonucleotide to a solid matrix; b) adding an additional oligonucleotide; c) performing ligation of the oligonucleotide from steps a) and b) in an orientation; d) removing excess reactants and enzymes from the reaction preparation; e) effecting cleavage of the ligation product from step c) with a restriction system that cleaves outside the recognition sequence, whereby cleavage is effected in the shortened or lengthened oligonucleotide from step a) or in the oligonucleotide from step b); f) separating the reaction mixture from the lengthened or shortened oligonucleotide from step a); g) repeating at least one steps b) to f); h) performing successive sequence-independent linkage of the fragments obtained after executing steps a) to g) until the desired product is obtained.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein parallel ausführbares und automatisierbares Verfahren zur Herstellung einer beliebigen Nukleinsäure, umfassend die Schritte: a) Kopplung eines Oligonukleotids an eine feste Matrix; b) Zugabe eines weiteren Oligonukleotids; c) Ligation der Oligonukleotide aus Schritt a) und b) in einer Orientierung; d) Entfernung überschüssiger Reaktanden und Enzyme aus dem Reaktionsansatz; e) Spaltung des Ligationsprodukts aus Schritt c) mit einem ausserhalb der Erkennungssequenz spaltenden Restriktionsenzym, wobei die Spaltung entweder im Oligonukleotid aus Schritt a) oder im Oligonukleotid aus Schritt b) stattfindet; f) Abtrennen des Reaktionsgemisches vom in Schritt e) erhaltenen verlängerten oder verkürzten Oligonukleotid aus Schritt a); g) mindestens einmaliges Wiederholen der Schritte b) bis f); h) sukzessive sequenzunabhängige Verknüpfung der nach Durchführung der Schritte a) bis g) erhaltenen Fragmente bis zum Erhalt des gewünschten Produkts.

		•
		•
		•
		•

1

5

30

# Verfahren zur Synthese von DNA-Fragmenten

Nach dem derzeitigen Stand der Technik müssen für eine Synthese einer etwa 2,5 kb großen

Nukleinsäuresequenz zunächst etwa 50 verschiedene, teilweise überlappende ca. 80mer Oligonukleotide synthetisiert und aufgereinigt werden. Diese werden dann paarweise oder in Subsets
hybridisiert und mittels einer Klenow-Polymerase-Reaktion aufgefüllt oder mit den außen
liegenden Oligonukleotiden als Primer in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) hergestellt und
(meist über einzubauende Restriktionsstellen) unidirektional miteinander verknüpft. Dieses

Verfahren ist als "Gap filling" Methode bekannt. Alternativ lassen sich Genfragmente durch
enzymatische oder chemische Ligation synthetisieren; diese Fragmente können dann nach
Aufreinigung und/oder Klonierung zu größeren Genabschnitten zusammengesetzt werden (sog.
Cassettenmethode). Beide Prozeduren erfordern im Idealfall mindestens eine Woche, im Regelfall jedoch eher 6-12 Wochen, mitunter sogar 6 Monate. Sequenzielle, an Festphasen gebundene

Verfahren haben wegen der Vielzahl der notwendigen Reaktionsschritte nur geringe Ausbeuten
und sind daher auch sehr fehleranfällig.

Eines der Hauptprobleme besteht darin, daß längere Oligonukleotide aus Gründen der Kopplungseffizienz, die selbst bei gut verlaufenden Synthesen nur 99% pro Schritt erreicht, immer einen unvermeidbaren Anteil an Abbruchprodukten aufweisen. Darüber hinaus kommt es auch zu Deletionen, die aus nicht 100%igem Capping resultieren. Selbst bei sehr guten Synthesen liegt dieser Anteil bei ca. 0,25% pro Kopplungsschritt. Auch die Abtrennung der Tritylschutzgruppen nach Beendigung der Synthese verläuft nicht vollständig. Die so entstandenen unvollständigen Oligonukleotidprodukte können selbst mit großem Aufwand von längeren Oligonukleotiden nicht vollständig abgetrennt werden.

Bei einer durchschnittlichen Kopplungseffizienz von 98% erhält man beispielsweise bei einem 80mer eine Ausbeute des gewünschten Produkts mit voller Länge von lediglich 19.86%. Mit den heutzutage verfügbaren Aufreinigungsverfahren kann das gewünschte Endprodukt in einer

2

Reinheit von bestenfalls 95% dargestellt werden. Auch wenn dann nur noch ein kleiner Teil der endgereinigten Oligonukleotide fehlerhaft ist, steigt dennoch die Wahrscheinlichkeit einer fehlerhaften Endsequenz mit der Zahl der eingesetzten Oligonukleotide dramatisch an. Eine Sequenz, die sich aus 50 der beschriebenen Oligonukleotide zusammensetzt, ist demnach nur in 7,7% aller Fälle korrekt und muss deshalb in aller Regel nachgearbeitet werden. Ein relativ seltener Einbau falscher Basen aufgrund von Fehlkopplungen während der Synthese ist dabei nicht berücksichtigt.

Auf Grund der Vielfalt möglicher Sequenzen selbst relativ kurzer Oligonukleotide (bereits von einem 30mer existieren über 10<sup>18</sup> mögliche Sequenzvarianten) ist es zudem praktisch unmöglich, Oligonukleotide für verschiedene Genkonstrukte wieder zu verwenden. Daher ist es technisch nicht machbar, sämtliche zur Generierung beliebiger Sequenzen benötigte Oligonukleotide vorzuhalten. Für jedes neue Genkonstrukt müssen jeweils neue Oligonukleotide synthetisiert und aufgereinigt werden. Nur ein Bruchteil des synthetisierten Materials wird jedoch tatsächlich für die Gensynthese eingesetzt, der Rest kann aus oben beschriebenen Gründen nicht verwertet werden. Die nicht gelöste Einbindung der Oligonukleotidsynthese und deren Aufreinigung in den Gensyntheseprozess ist eines der Haupthindernisse, weswegen eine vollständige Automatisierung dieses Prozesses derzeit technisch nur äußerst schwierig und praktisch wahrscheinlich überhaupt nicht zu realisieren.

20

10

15

Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe besteht somit in der Bereitstellung eines Verfahrens zur effizienten Synthese doppelsträngiger DNA-Fragmente beliebiger Sequenz und Länge. Eine weitere Aufgabe besteht darin, eine Methode bereit zu stellen, welche es erlaubt, beliebige DNA-Moleküle aus einer begrenzten Bibliothek von Grundbausteinen zusammen zu setzen. Eine weitere Aufgabe besteht darin, ein Verfahren aufzuzeigen, welches die parallele Synthese und die sequenzunabhängige Verknüpfung beliebiger Genfragmente gestattet. Die Erfüllung dieser beiden Voraussetzungen ist notwendig für die Realisierung einer kompletten Automatisierung des Gensyntheseverfahrens. Eine weitere Aufgabe besteht in der Bereitstellung eines Kits zur automatisierten Herstellung doppelsträngiger DNA-Fragmente.

30

25

Die Aufgabe wird gelöst durch die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend die Schritte:

- a) Kopplung eines Oligonukleotids mit einem Ende an eine feste Matrix, wobei die Kopplung über eine Modifikation erfolgt, und das Oligonukleotid eine Erkennungssequenz für ein TypIIS Restriktionsenzym enthält, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet,
- b) Zugabe eines weiteren, mindestens teilweise doppelsträngigen Oligonukleotids mit einer anderen Erkennungssequenz für ein TypIIS Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, als in Schritt a), wobei dieses Oligonukleotid nicht an die Matrix binden kann,
- c) Ligation der Oligonukleotide aus Schritt a) und b) in der durch die Blockierung der nicht zu ligierenden Enden vorgegebenen Orientierung,
- d) Entfernen nicht verbrauchter Reaktanden sowie Enzyme,
- e) Spaltung des Ligationsprodukts aus Schritt c) mit einem TypIIS Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung im Oligonukleotid aus Schritt a) stattfindet,
- 15 f) Abtrennen des erhaltenen Nukleinsäuremoleküls vom Reaktionsgemisch.

Die Aufgabe wird ferner gelöst durch die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend die Schritte:

a) bis d) wie oben,

WO 00/75368

5

10

- e) Spaltung des Ligationsprodukts aus Schritt c) mit einem TypIIS Restriktionsenzym,
   welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung in der
   Nukleinsäuresequenz des Oligonukleotids aus Schritt b) stattfindet,
  - f) Abtrennen des Reaktionsgemisches vom in Schritt e) erhaltenen verlängerten Oligonukleotid aus Schritt a),
- 25 g) mindestens einmaliges Wiederholen der Schritte b) bis f).

Die Aufgabe wird ferner gelöst durch die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend die Schritte:

- a) bis g) wie oben,
- 30 h) Spaltung des erhaltenen Nukleinsäuremoleküls mit einem TypIIS Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung im Oligonukleotid aus Schritt a) stattfindet, und gegebenenfalls

4

- i) Spaltung des erhaltenen Nukleinsäuremoleküls mit einem TypIIS Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung im Oligonukleotid aus Schritt b) stattfindet.
- Bevorzugt ist ein Verfahren, wobei nach Schritt c) als Schritt c) eine Exonuklease- und/oder Phosphatase-Reaktion durchgeführt wird. Ferner bevorzugt ist ein Verfahren, wobei das Reaktionsgemisch des Schrittes c)' nach der Reaktion entfernt wird. Ferner bevorzugt ist ein Verfahren, wobei in der letzten Wiederholung der Schritte b) bis f) der Schritt e) nicht durchgeführt wird. Ferner bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die erhaltene Nukleinsäure durch Restriktionsspaltung vom Oligonukleotid aus Schritt a) abgetrennt wird. Ferner bevorzugt ist ein 10 Verfahren, wobei die Kopplung des Oligonukleotids aus Schritt a) an die feste Matrix über eine Modifikation erfolgt. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die Modifikation ein Biotinrest, ein Digoxigeninrest, ein Fluoresceinisothiocyanat (FITC), eine Aminoverbindung oder ein Succinylester ist. Ferner bevorzugt ist ein Verfahren, wobei das Oligonukleotid aus 15 Schritt a) und/oder b) über einen Loop verfügt. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, wobei das Oligonukleotid aus Schritt a) mit dem Loop an die feste Matrix gekoppelt ist. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die feste Matrix ein Kügelchen (bead), vorzugsweise aus Glas oder Polystyrol, ein Objektträger, ein DNA Chip, die Vertiefung einer Mikrotiterplatte (well) oder ein Reaktionsröhrchen ist. Insbesondere bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die feste Matrix einen Streptavidinrest, einen anti-Digoxigenin-Antikörper oder einen anti-FITC-Antikörper umfasst. Ferner bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die Oligonukleotide aus Schritt a) und b) an ihren zu ligierenden Enden über zueinander komplementäre Einzelstrangüberhänge verfügen. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die Einzelstrangüberhänge 1, 2, 3, 4 oder 5 Nukleotide lang sind. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die synthetisierte Nukleinsäure in einem abschließenden Schritt mit einer replikationsfähigen DNA (einem 25 Plasmidvektor, einer Phagen- oder Virus-DNA, einem artifiziellen Chromosom, einem PCR Produkt oder einer weiteren künstlich hergestellten DNA verknüpft wird. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren zur Herstellung Codon-optimierter offener Leseraster, zur gezielten Mutagenese von Promotoren, Enhancern oder DNAs, welche für Proteine codieren. Insbesondere bevorzugt ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure als Codon-optimierte DNA-Vakzine, Mutationsanalyse von Proteindomänen, als Matrize für Designerproteine, Expressionskonstrukt für in vitro Proteinsynthese, zur Herstellung von Ribozymen oder

Aptameren, als Sonde zum Nachweis pathogener Mikroorganismen, als Sonde zum Nachweis der Expression von Genen, zum Nachweis allelspezifischer Mutationen, zum Nachweis von Protein/Protein-Bindung, Protein/Peptid-Bindung und/oder der Bindung niedermolekularer Stoffe an Proteine.

5

10

15

Die Aufgabe wird ferner gelöst durch die Bereitstellung eines Kits zur Herstellung einer Nukleinsäure nach dem erfindungsgemäßen Verfahren, umfassend

- a) eine Bibliothek von 1 bis 1.048.576 verschiedenen Oligonukleotiden enthält, wobei die Oligonukleotide über eine Modifikation an einem Ende an eine feste Matrix koppelbar sind und das Oligonukleotid eine Erkennungssequenz oder einen Teil der Erkennungssequenz für ein TypIIS Restriktionsenzym enthält, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet,
- b) eine weitere Bibliothek von 4 bis 1.048.576 verschiedenen Oligonukleotiden enthält, wobei jedes der Oligonukleotide eine Erkennungssequenz für ein TypIIS Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, enthält, dass von dem TypIIS Restriktionsenzym aus a) verschieden ist, und gegebenenfalls den anderen Teil der Erkennungssequenz des Restriktionsenzyms aus Schritt a) enthält,
- c) eine feste Matrix,

20

d) Reservoire der für die Herstellung des Nukleinsäuremoleküls benötigten Enzyme und/oder anderer Reagenzien.

Bevorzugt ist ein Kit, wobei die Enzyme eine Ligase oder Topoisomerase und/oder ein oder mehrere Restriktionsenzym(e) und/oder eine Exonuklease und/oder eine Phosphatase umfassen.

25 Besonders bevorzugt ist ein Automat, welcher nach Eingabe der gewünschten Basensequenz sämtliche Reaktionsschritte fest legen und selbsttätig abarbeiten kann.

Die Erfindung wird weiter durch die folgenden Figuren erläutert.

30 F

Figur 1 zeigt eine schematische Darstellung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Bio bedeutet eine Modifikation (z.B. Biotin), mit der das Anchor-Oligonukleotid an eine feste Matrix (z.B. Streptavidin) gekoppelt ist. T, G, C, A und N bezeichnen die Nukleinsäurebasen, wobei T

6

Thymidin, G Guanin, C Cytosin, A Adenin und N eine beliebige der vier Nukleinsäurebasen bedeutet.

Figur 2 zeigt schematisch den Aufbau eines EasyPro™ Transkriptions/Translationssystems von PCR-Fragmenten. Bio bedeutet eine Modifikation, mit der das Anchor-Oligonukleotid an eine feste Matrix gekoppelt ist. 5'-UTR bedeutet 5'-untranslatierter Bereich. ATG bedeutet Startcodon. 6 x His bedeutet eine sechsmalige Aneinanderreihung von Histidincodons. Single T overhang bedeutet einen Überhang von einem Thymidinrest.

10 Figur 3 zeigt eine schematische Darstellung eines Minireaktors für die Proteinsynthese.

Figur 4 zeigt eine schematische Darstellung der Produktion einer Peptidlibrary mit dem QuickPep<sup>TM</sup>-Verfahren. Bio bedeutet eine Modifikation, mit der das Anchor-Oligonukleotid an eine feste Matrix gekoppelt ist. T7 bedeutet T7-Promotor. rbs bedeutet interne Ribosomenbindungsstelle. ATG bedeutet Startcodon. EK bedeutet Enterokinase-Schnittstelle. Peptid ORF bedeutet den offenen Leserahmen des Peptids. STOP bedeutet das Stopcodon. Poly A bezeichnet den poly-A-Schwanz.

Figur 5 zeigt eine schematische Darstellung der Selektion von Ribozymen mit dem 20 RiboSelect<sup>TM</sup>-Verfahren.

Figur 6 zeigt eine schematische Darstellung des Nachweises von Pathogenen nach Anreicherung durch PCR (PathoCheck<sup>TM</sup>). Bio bedeutet eine Modifikation, mit der das Anchor-Oligonukleotid an eine feste Matrix gekoppelt ist.

25

Figur 7 zeigt eine schematische Darstellung der Identifizierung bekannter Allele durch Ligation markierter Splinker (LIMA<sup>TM</sup>). Bio bedeutet eine Modifikation, mit der das Anchor-Oligonukleotid an eine feste Matrix gekoppelt ist. x bedeutet die Stelle, an der die zu bestimmende Modifikation vorliegt.

30

Figur 8 zeigt eine schematische Darstellung der Parallelanalyse von mRNA-Arrays (PAMINATM).

7

Figur 9 zeigt die schematische Darstellung eines Anchor-Oligonukleotids. Bio bedeutet eine Modifikation, mit der das Anchor-Oligonukleotid an eine feste Matrix gekoppelt ist. T, G, C, A bezeichnen die Nukleinsäurebasen, wobei T Thymidin, G Guanin, C Cytosin, A Adenin bedeutet. Esp3I bezeichnet ein Restriktionsenzym.

Figur 10 zeigt die schematische Darstellung eines Anchor-Oligonukleotids. Bio bedeutet eine Modifikation, mit der das Anchor-Oligonukleotid an eine feste Matrix gekoppelt ist. T, G, C, A bezeichnen die Nukleinsäurebasen, wobei T Thymidin, G Guanin, C Cytosin, A Adenin bedeutet. BpiI bezeichnet ein Restriktionsenzym.

Figur 11 zeigt die schematische Darstellung eines Bipartite-Anchor-Oligonukleotids. Bio bedeutet eine Modifikation, mit der das Anchor-Oligonukleotid an eine feste Matrix gekoppelt ist. T, G, C, A bezeichnen die Nukleinsäurebasen, wobei T Thymidin, G Guanin, C Cytosin, A Adenin bedeutet.

Figur 12 zeigt die schematische Darstellung eines Splinker-Oligonukleotids. T, G, C, A bezeichnen die Nukleinsäurebasen, wobei T Thymidin, G Guanin, C Cytosin, A Adenin bedeutet. Bsal und Eco31I bezeichnen Restriktionsenzyme.

20

10

15

Figur 13 zeigt die schematische Darstellung eines Bipartite-Splinker-Oligonukleotids. T, G, C, A bezeichnen die Nukleinsäurebasen, wobei T Thymidin, G Guanin, C Cytosin, A Adenin bedeutet. Bsal und Eco31I bezeichnen Restriktionsenzyme.

25 Figur 14 zeigt eine schematische Darstellung des Synthesewegs längerer Nukleinsäuren mit dem erfindungsgemäßen Verfahren. Die Balken symbolisieren doppelsträngige DNA-Fragmente, welche parallel durch hintereinander geschaltete Ligations/Restriktionszyklen synthetisiert wurden. Im Endprodukt benachbarte Teilabschnitte werden jeweils durch die Ligation eines aufligierten Splinkers mit einem aufligierten Anchor verbunden. Die so gewonnenen größeren Fragmente werden dann im nächsten Schritt wieder entweder mit der Anchor-spezifischen oder der Splinker-spezifischen Restriktionsendonuklease geschnitten und über komplementäre Überhänge miteinander verknüpft usw., so dass sich die Länge der Fragmente mit jedem Schritt

8

verdoppelt. Die Verknüpfung ist vollkommen sequenzunabhängig, da die Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsendonukleasen in den jeweils abgeschnittenen Teilen der aufligierten Fragmente liegen und daher nicht in die wachsende Nukleinsäure eingebaut werden. Die Zahlen über den Balken bedeuten die Größe der Fragmente in Basenpaaren. Ausgehend von 20 Basenpaar großen DNA-Fragmenten ergibt sich somit nach vier Transpositionen eine max. Länge von 320 Basenpaaren, nach fünf Transpositionen eine Länge von 640 Basenpaaren, nach sechs Transpositionen eine Länge von 1280 Basenpaaren, nach sieben Transpositionen eine Länge von 2560 Basenpaaren, usw.

## 10 Definitionen

Der hier verwendete Begriff "parallel" oder "parallele Synthese" bedeutet, daß verschiedene erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekule gleichzeitig in getrennten Reaktionsansätzen synthetisiert werden können, um dann mit dem erfindungsgemäßen Verfahren z.B. als Anchor oder Splinker zu einem verlängerten Nukleinsäuremolekule ligiert werden können.

Der hier verwendete Begriff "Sloning" (Sequentielle Ligation von Oligonukleotiden auf Sequenz-unabhängige Weise) bezieht sich auf ein Verfahren zur aufeinanderfolgenden Ligation von Oligonukleotiden mit beliebiger Sequenz.

20

25

15

Der hier verwendete Begriff "Anchor" oder "Anchor-Oligonukleotid" bezieht sich auf ein Oligonukleotid, welches über eine Modifikation an eine feste Matrix gekoppelt werden kann. Im Sinne der vorliegenden Erfindung enthält das Oligonukleotid in seinem doppelsträngigen Anteil ferner eine Restriktionsschnittstelle für ein TypIIS Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet.

Der hier verwendete Begriff "Splinker" oder "Splinker-Oligonukleotid" bezieht sich auf ein Oligonukleotid, welches über keine bzw. eine andersgeartete Modifikation verfügt, so daß es nicht selbst an die Matrix bindet, an welche die Anchor-Oligonukleotide gekoppelt sind.

30

Der hier verwendete Begriff "Dumbbell" (auf dt.: Glockenklöppel) bezieht sich auf eine DNA-Struktur, die durch einen Doppelstrang charakterisiert ist, der von zwei Loops flankiert wird.

9

Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend die Schritte:

- a) Kopplung eines Oligonukleotids mit einem Ende an eine feste Matrix, wobei die Kopplung über eine Modifikation erfolgt, und das Oligonukleotid eine Erkennungssequenz für ein TypIIS Restriktionsenzym enthält, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet.
- b) Zugabe eines weiteren, mindestens teilweise doppelsträngigen Oligonukleotids mit einer anderen Erkennungssequenz für ein TypIIS Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, als in Schritt a), wobei dieses Oligonukleotid nicht an die Matrix binden kann,
- d) Ligation der Oligonukleotide aus Schritt a) und b) in der durch die Blockierung der nicht zu ligierenden Enden vorgegebenen Orientierung,
- h) Entfernen nicht verbrauchter Reaktanden sowie Enzyme,
- Spaltung des Ligationsprodukts aus Schritt c) mit einem TypIIS Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung im Oligonukleotid aus Schritt a) stattfindet,
- j) Abtrennen des erhaltenen Nukleinsäuremoleküls vom Reaktionsgemisch.

Ein weiteren Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Nukleinsäure-20 moleküls, umfassend die Schritte:

a) bis d) wie oben,

5

10

15

25

- e) Spaltung des Ligationsprodukts aus Schritt c) mit einem TypIIS Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung in der Nukleinsäuresequenz des Oligonukleotids aus Schritt b) stattfindet,
- f) Abtrennen des Reaktionsgemisches vom in Schritt e) erhaltenen verlängerten Oligonukleotid aus Schritt a),
  - k) mindestens einmaliges Wiederholen der Schritte b) bis f).

Ein weiteren Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Nukleinsäure-30 moleküls, umfassend die Schritte:

- a) bis g) wie oben,
- h) Spaltung des erhaltenen Nukleinsäuremoleküls mit einem TypIIS Restriktionsenzym,

10

welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung im Oligonukleotid aus Schritt a) stattfindet, und gegebenenfalls

 Spaltung des erhaltenen Nukleinsäuremoleküls mit einem TypIIS Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung im Oligonukleotid aus Schritt b) stattfindet.

Eines der beiden in jedem Reaktionsschritt zu verknüpfenden Oligonukleotide (das sog. "Anchor"-Oligonukleotid) ist über eine Modifikation, z.B. eine niedermolekulare chemische Verbindung wie Biotin oder Digoxigenin, an eine feste Matrix koppelbar. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich dabei um magnetische Streptavidin-beschichtete oder anti-Digoxigenin-beschichtete Beads. Das andere Oligonukleotid (das sog. "Splinker"-Oligonukleotid) besitzt auch ein blockiertes Ende, aber keine derartige oder aber eine andersartige Modifikation. Der Punkt auf den es ankommt ist der, dass die Anchor-Oligonukleotide durch die Bindung an eine geeignete Matrix von den Splinker-Oligonukleotiden getrennt werden können. Es können daher beliebige Verbindungen z.B. Biotin, Digoxigenin, Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Aminoverbindungen, Succinylester und andere dem Fachmann geläufige Verbindungen, verwendet werden, sofern sie geeignet sind, direkt oder indirekt (z.B. über einen Antikörper) eine Bindung an eine feste Phase zu vermitteln.

Anchor-Oligonukleotide können entweder aus einem einzigen zum Teil selbstkomplementären Oligonukleotid bestehen, welches über eine Modifikation vorzugsweise in der Loopsequenz an eine feste Phase koppelbar ist, oder aus zwei einzelsträngigen Oligonukleotiden, welche einen Doppelstrang bilden, vorzugsweise mit einem Einzelstrangüberhang. Da nur einer der beiden Stränge an eine Matrix gekoppelt werden muss, kann der andere wenn nötig durch Alkali oder Hitze denaturiert und abgetrennt werden (etwa um als Template für eine PCR-Reaktion zu dienen). Um sicherzugehen, daß auch bei solchen zweigeteilten Anchor-Oligonukleotiden nur ein Ende ligierbar ist, werden die nicht für die Ligation benötigten Enden entsprechend blockiert. Nukleinsäuresequenzen beispielhafter Anchor-Oligonukleotide sind

## 30 Anchor A31

5

10

15

5'-GCTTCGAGACGCGTTTTCGCGTCTCG-3' (SEQ ID NR:1; FIG. 9)

PCT/DE00/01863 WO 00/75368

11

Anchor A2+

5'-AGAATGGTCTTCGAGCTTTTGCTCGAAGACCA-3' (SEQ ID NR:2; FIG. 10)

Bipartite Anchor

5'-CGCGGATCCGCGGCGT-3' (SEQ ID NR:3, FIG. 11)

5'-CGAGACGCCGCGGATCCGCG-3' (SEQ ID NR:4, FIG. 11)

Splinker-Oligonukleotide können entweder aus einem einzigen zum Teil selbstkomplementären Oligonukleotid bestehen oder aus zwei einzelsträngigen Oligonukleotiden, welche einen Doppelstrang bilden, vorzugsweise mit einem Einzelstrangüberhang, d.h. man hat ein mindestens teilweise komplementäres Paar von Oligonukleotiden, wobei die jeweils nicht zu ligierenden Die bevorzugte Enden der beiden Einzelstränge blockiert sein müssen. Einzelstrangüberhangsequenz muss zu dem jeweils zu ligierenden Anchor-Oligonukleotid komplementär sein. Nukleinsäuresequenzen beispielhafter Splinker-Oligonukleotide sind

15

30

Splinker S1H

5`-AAGCTTCTGGAGACCGCTTTTGCGGTCTCCAGAA-3` (SEQ ID NR:5, FIG. 12)

Bipartite Splinker

(SEQ ID NR:6, FIG. 13) 20 5'-CTCGAAGCGGAGACCGCCAC-3'

5'-GTGGCGGTCTCCGCTT-3' (SEO ID NR:7, FIG. 13)

Sowohl Anchor- wie auch Splinker-Oligonukleotide können Überhänge einer definierten Länge enthalten, in einer bevorzugten Ausführungsform eins bis fünf Nukleotide. Diese Überhänge sind 25 bei den jeweils zu ligierenden Oligonukleotiden komplementär zueinander, am 5' Ende phosphoryliert und können nur in einer Orientierung miteinander ligiert werden. Dabei entsteht ein ligiertes Oligonukleotid mit z.B. einer sogenannten "Dumbbell"-Struktur. Um eine vollständige Ligation aller verfügbaren Anchor Oligonukleotide zu erreichen, können die anzuligierenden Splinker-Oligonukleotide in 2 bis 10fachem Überschuß zugesetzt werden. Die überschüssigen, nicht-reagierten Splinker werden nach jedem Ligationsschritt mit Puffer weggewaschen. Werden z.B. mit Streptavidin beschichtete magnetische Beads verwendet, können die Beads mit den über eine Streptavidin/Biotin-Bindung gebundenen Anchor-

PCT/DE00/01863

Oligonukleotiden zusammen mit den anligierten Splinkern durch den Einsatz eines Magneten im Reaktionsansatz zurückgehalten werden. Alternativ können z.B. direkt mit Streptavidin beschichtete Wells, Glas(beads), Objektträger, DNA-Chips oder beliebige andere feste Phasen

verwendet werden. Beads werden in der Regel bevorzugt, weil sie eine größere Oberfläche und

12

5 daher eine höhere Bindungskapazität aufweisen.

10

15

20

25

30

Um weitere Ligationen durchführen zu können, muss eine Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease vorhanden sein, die die Nukleinsäuresequenz außerhalb dieser Erkennungssequenz in dem anligierten Splinker-Oligonukleotid schneidet. Beispiele für solche Enzyme sind BpiI, Esp3I, Eco31I, SapI etc. Für das erfindungsgemäße Verfahren nützliche Restriktionsenzyme und ihre Erkennungssequenzen und Schnittstellen sind in der Rebase-Datenbank unter http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html zu finden. An der in den Splinker-Oligonukleotiden enthaltenen Restriktionsschnittstelle werden die Ligationsprodukte so geschnitten, daß ein Teil der Splinkersequenz am Anchor-Oligonukleotid verbleibt. Gleichzeitig wird dadurch ein Sequenzüberhang erzeugt, der für die Ligation eines weiteren Splinker-Oligonukleotids herangezogen werden kann. Der andere abgespaltene Teil und der nicht ligierten Rests des Splinker-Oligonukleotids, das Restriktionsenzym sowie der Restriktionspuffer werden aus dem Reaktionsansatz ausgewaschen, worauf ein weiterer Zyklus beginnt. Der Zyklus kann entweder nur einmal durchgeführt oder aber mehrere Male wiederholt werden, bevor die so verlängerten Oligonukleotide ihrerseits mit den parallel synthetisierten Nachbarfragmenten verknüpft werden. Da die beim Schneiden mit den verschiedenen Restriktionsendonukleasen entstehenden, jeweils zueinander komplementären Überhänge aus dem zu synthetisierenden Gen stammen, die Erkennungssequenzen hingegen in den wieder abgeschnittenen Teilen der Anchorbzw. Splinker-Oligonukleotide lokalisiert sind, können die benachbarten Fragmente völlig unabhängig von ihrer Sequenz verknüpft werden. Insbesondere lassen sich dadurch selbst große Gene in vielen parallel ablaufenden Teilreaktionen in nur wenigen Reaktionsschritten zusammen bauen. Im optimalen Fall lässt sich beispielsweise ein 2 kb großes Gen in lediglich 9 Schritten aus 256 Einzelreaktionen zusammen setzen. Ein gleich großes Gen würde bei linearer Synthese (rekursiv, aber nicht parallel) und bei Verwendung von 60mer Oligos mehr als 30 Schritte benötigen. Da sowohl enzymatische als auch chemische Ligationsverfahren Ausbeuten von meist nur 80-90% aufweisen, nimmt die Gesamtausbeute mit der Anzahl der benötigten Reaktionsschritte exponentiell ab, weswegen Verfahren mit wenigen Reaktionsschritten

vorteilhaft sind. Um nicht-umgesetzte Anchor-Oligonukleotide von der weiteren Synthese auszuschließen, kann fakultativ nach der Ligation ein Exonuklease- und/oder Phosphatase-Schritt zwischengeschaltet werden, wodurch der Überhang oder zumindest die für die folgende Ligation erforderliche 5'-Phosphatgruppe entfernt wird. Der Anteil an nicht-umgesetzten Anchor-Oligonukleotiden ist bei einem eingesetzten Überschuß an Splinker-Oligonukleotiden nur gering. Eine Weiterreaktion sollte zudem nur dann möglich sein, wenn dieselbe Sequenz ein weiteres Mal anligiert wird, weswegen die Gefahr einer Kontamination mit nicht oder nur teilweise umgesetzten Anchor Oligonukleotiden als relativ gering anzusehen ist.

PCT/DE00/01863

Die so nach mehreren Ligations- und Restriktionszyklen aufligierte Nukleinsäuresequenz kann 10 anschließend durch Schneiden mit einem Restriktionsenzym, das eine Nukleinsäuresequenz in dem ursprünglichen Anchor-Oligonukleotid spezifisch erkennt, von dem an der Matrix verbleibenden Anchor-Oligonukleotid abgetrennt werden. Die aufligierte Nukleinsäuresequenz hängt nun an dem zuletzt anligierten Splinker-Oligonukleotid. Das verlängerte Splinker-Oligonukleotid wird nach Inaktivierung des Restriktionsenzyms aus dem ursprünglichen Reaktionsansatz in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dort mit einem aufligierten Anchor-Oligonukleotid verknüpft, das mit einem Splinker-Oligonukleotid spezifischen Restriktionsenzym geschnitten wurde (1. Transposition). Dem Fachmann ist ersichtlich, daß es sich bei den aufligierten Nukleinsäuresequenzen um frei wählbare Sequenzen handeln kann, die sowohl unterschiedlich als auch identisch sein können. Das aus der 1. Transposition resultierende 20 Ligationsprodukt wird wiederum mit einer Anchor-spezifischen Restriktionsendonuklease geschnitten und erneut mit einem analog erhaltenen aufligierten Anchor-Oligonukleotid ligiert (2. Transposition). Auf diese Weise verdoppelt sich die Länge der aufligierten Nukleinsäuresequenzen dann mit jedem weiteren Schritt. Die Verknüpfung der DNA-Fragmente erfolgt jeweils über komplementäre Überhänge, ist aber ansonsten vollkommen sequenzunabhängig. Die einzige Einschränkung dabei ist, daß die Anchor- und Splinkerspezifischen Restriktionsschnittstellen in der zu synthetisierenden Sequenz nicht vorkommen dürfen, weil sonst die DNA auch intern geschnitten werden würde. Jeweils vor einer Spaltung an einer Anchor-spezifischen Restriktionsschnittstelle und der darauf folgenden Transposition kann fakultativ ein Exonukleaseschritt eingeführt werden, um die Transposition nicht vollständig aufligierter Splinker-Oligonukleotide zu verhindern. Die für das Verfahren notwendigen sequenzspezifischen Spaltungen können statt durch TypIIS Restriktionsendonukleasen im

14

Prinzip auch durch analog funktionierende Ribozyme erfolgen.

Ausgehend von einer 20 Basenpaar langen Sequenz (die man für Splinker mit einem 4 nt Überhang durch 5 sukzessive Ligationen der hierfür benötigten Ursprungs-Splinker aus der Bibliothek erhalten kann), lässt sich durch lediglich 7 weitere Ligationsschritte eine doppelsträngige DNA-Sequenz von 2560 Basenpaaren Länge synthetisieren. Bei Zykluszeiten von ca. 1 Stunde kann eine beliebige DNA-Sequenz dieser Länge binnen 12 Stunden synthetisiert werden. Durch eine Optimierung der Reaktionsbedingungen kann der Zeitaufwand auf etwa 6 Stunden halbiert werden.

10

Bei 4 Nukleotide langen Überhängen wird eine Bibliothek von 65536 verschiedenen Splinker-Oligunukleotiden benötigt, um alle möglichen Nukleinsäuresequenzen herstellen zu können. Diese Zahl ergibt sich aus folgender Berechnung: es gibt 256 mögliche 4 Nukleotide lange Überhänge ( $4^4 = 256$ ), ebenso viele Sequenzvarianten existieren für die vier direkt angrenzenden Nukleotide, die den Überhang beim nächsten Ligationsschritt bilden. Insgesamt ergibt sich daraus eine Gesamtzahl von  $4^4$  mal  $4^4 = 4^8 = 65536$  Splinker-Oligonukleotide, mit denen sämtliche möglichen Sequenzvarianten dargestellt werden können. Bei 3 Nukleotide langen Überhängen reduziert sich die Komplexität der benötigten Splinkerbibliothek entsprechend auf  $4^3$  mal  $4^3$  = 4096, bei zwei Nukleotide langen Überhängen auf  $4^2$  mal  $4^2$  = 256, bei 5 Nukleotide langen Überhängen würde sie sich auf  $4^5$  mal  $4^5$  = 1048576 erhöhen. Voraussetzung für dieses Baukastensystem ist das Vorhandensein einer kompletten Splinkerbibliothek (für 2 nt Überhänge 256 Oligonukleotide, für 3 nt Überhänge 4096 Oligonukleotide, für 4 nt Überhänge 65536 Oligonukleotide, für 5 nt Überhänge 1048576 Oligonukleotide) sowie einer Anchorbibliothek (4, 16, 64, 256 oder 1024 Oligonukleotide bei 1, 2, 3, 4 oder 5 nt Überhängen). Letztere ist allerdings nicht unbedingt nötig, da die verschiedenen Überhangsequenzen ebenso gut durch einen vorgeschalteten Ligationsschritt mit geeigneten Splinker-Oligonukleotiden erzeugt werden können.

Prinzipiell sind alle Einzelschritte des erfindungsgemäßen Verfahrens automatisierbar, so daß die Herstellung ganzer Gene so einfach ist wie die Synthese von Oligonukleotiden. Zudem eröffnet sich durch das erfindungsgemäße Verfahren ein Kostensenkungspotential in beträchtlicher Höhe. Erstens können alle benötigten Enzyme großtechnisch hergestellt werden. Zweitens können die

Investitionen für die Splinkerlibrary deutlich gesenkt werden, indem die einzelnen Splinker-Oligonukleotide bis auf die letzten 4 Nukleotide des 5'-Überhangs en bloc synthetisiert werden. Die Synthesereaktion wird dann in 4 gleiche Teile portioniert; die vier verschiedenen Nukleotide werden dann in separaten Reaktionen an der nächsten (im Endprodukt viertletzten) Position angehängt. Danach werden die vier Einzelreaktionen wiederum geviertelt, wonach das drittletzte Nukleotid angehängt wird usw. Statt 65536 Einzelsynthesen würde man dann nur 256 Synthesen in einem entsprechend größeren und deswegen günstigeren Maßstab benötigen. Ferner können die 256 möglichen 4 Nukleotide langen Überhänge durch eine "blunt end ligation" an 256 verschiedene Anchor-Oligonukleotide, anschließender Exonukleasebehandlung, Waschen und schließlich Restriktion mit der Anchor-spezifischen Restriktionsendonuklease erzeugt werden. Auf diese Weise könnten die 65536 benötigten Splinker-Oligonukleotide kostengünstig hergestellt werden. Ferner könnte auf diese Art und Weise eine aufwendige Aufreinigung aller 65536 Splinker-Oligonukleotide umgangen werden, da nichtreaktive Fehlsequenzen durch dieses Verfahren entfernt werden. Da eine extrem hohe Reinheit der eingesetzten Oligonukleotide essentiell für das Gelingen fehlerloser Synthesen ist, müssen diese sowieso entsprechend vorbehandelt werden. Daneben muss eine praktisch vollständige Abwesenheit von Exonukleasen während der Restriktions- und Ligationsschritte gewährleistet sein, damit die Überhangsequenzen intakt bleiben, die für die nachfolgenden Ligationen benötigt werden. Vor allem wenn Exonuklease-Zwischenschritte zur Entfernung nichtligierter Anchor-Oligonukleotide verwendet werden, müssen diese Exonukleasen gründlich weggewaschen und/oder inaktiviert werden.

10

15

20

30

Die Anchor- und Splinker-Oligonukleotide können sowohl jeweils aus einem selbstkomplementären Einzelstrang als auch aus je zwei komplementären Plus- und Minus-Strängen
zusammengesetzt werden. Die Nukleinsäuresequenzen müssen nicht vollständig komplementär
sein; die selbstkomplementären Einzelstrang-Oligonukleotide können einen Loop aufweisen und
die komplementären Plus- und Minus-Stränge können nur teilweise komplementär sein. Bei
Anchor- und Splinker-Oligonukleotiden, die aus je zwei komplementären Plus- und MinusSträngen zusammengesetzt sind, muss (i) die Schmelztemperatur des Doppelstranghybrids
genügend hoch sein, um eine Denaturierung der zusammengesetzten Anchor- und SplinkerOligonukleotide und einen möglicherweise daraus resultierenden unbeabsichtigten Transfer der
nicht an eine Festphase gekoppelten Einzelstränge zu verhindern und müssen (ii) die jeweils
nicht zu verlängernden Enden durch geeignete Modifikationen blockiert sein. Oligonukleotide

16

aus zwei komplementären Plus- und Minus-Strängen besitzen gegenüber Oligonukleotiden aus einem selbstkomplementären Einzelstrang bestimmte Vorteile. Selbstkomplementäre (Snap back) Oligonukleotide verursachen bei der Aufreinigung oft gewisse Schwierigkeiten, da sie in hoher Konzentration eine Tendenz zur Bildung von Netzwerken haben. Einzelsträngige Teiloligonukleotide sind auch kürzer und dadurch mit geringerem Aufwand in höherer Reinheit zu gewinnen. Für bestimmte erfindungsgemäße Ausführungsformen werden aus zwei Teiloligonukleotiden zusammengesetzte ("bi-partite") Anchor-Oligonukleotide verwendet.

5

15

20

In besonders bevorzugten Ausführungsformen enthalten die Anchor bzw. Splinker die folgenden Kombinationen an Erkennungssequenzen:

Anchor	Splinker
CGTCTCN^NNNN_ (Esp3I, BsmBI)	GGTCTCN^NNNN_ (BsaI, Eco31I,)
GGTCTCN^NNNN_ (BsaI, Eco31I,)	CGTCTCN^NNNN_ (Esp3I, BsmBI)
GAAGACNN^NNNN_ (BbsI, BpiI)	ACCTGCNNNN^NNNN_ (BspMI, Acc36I)
ACCTGCNNNN^NNNN_ (BspMI, Acc36I)	GAAGACNN^NNNN_ (BbsI, BpiI)
GCAGTG_NN^ (BtsI)	GCAATG_NN^ (BsrDI, Bse3DI,)
GCAATG_NN^ (BsrDI, Bse3DI,)	GCAGTG_NN^ (BtsI)
GTATCCNNNNN_N^ (BciVI, BfuI)	ACTGGGNNNN_N^ (BfiI, BmrI)
ACTGGGNNNN_N^ (Bfil, Bmrl)	GTATCCNNNNN_N^ (BciVI, BfuI)

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Kit zur Herstellung der Nukleinsäure nach dem erfindungsgemäßen Verfahren. Das Kit kann aus einer Bibliothek aller notwendigen Anchor- und Splinker-Oligonukleotide, ferner einer festen Phase, an welche die Anchor-Oligonukleotide gekoppelt werden können, vorzugsweise magnetisierte Beads, geeigneten Reaktionsbehältnissen, Ligase, gegebenenfalls einer Topoisomerase und/oder einer 3'-5'-Exonuklease und/oder Phosphatase, mindestens verschiedenen zwei TypII-Restriktionsendonukleasen, die außerhalb ihrer Erkennungssequenz schneiden, sowie aller benötigten Reaktionspuffer bestehen. Bevorzugt ist fernerhin eine Pipettierstation mit einem kühlbaren Probenvorratsbehälter mit einer entsprechenden Softwaresteuerung, die sämtliche Schritte des erfindungsgemäßen Verfahrens automatisch durchführt

Die vorliegende Erfindung erlaubt eine komplette Automatisierung des gesamten Gensynthese-25 prozesses durch die Bereitstellung von einer Bibliothek immer wieder zu benützender, 17

mindestens teilweise doppelsträngiger hochreiner Oligonukleotide mit Erkennungssequenzen für bestimmte TypIIS Restriktionsendonukleasen (sogenannte "Outside Cutter"). Die Automatisierung wird ferner erlaubt durch die Bereitstellung eines Verfahrens, welche die parallele Synthese von Genfragmenten und deren sequenzunabhängige Verknüpfung an jeder beliebigen Stelle erlaubt sowie aufgrund einer orientierungsgebundenen Verlängerung der Startmoleküle über deren Bindung an eine Festphase (die nicht zu ligierenden Enden sind durch geeignete Modifikationen bzw. Loopsequenzen blockiert) und eines definierten Sets rekursiver Prozeduren (Ligations-, Wasch- und Restriktionsschritte), die durch einen Roboter abgearbeitet werden können.

10

20

25

30

Nachstehend werden bestimmte Aspekte der vorliegenden Erfindung beispielhaft wiedergegeben, die auf der Komplettsynthese ganzer Gene durch das erfindungsgemäße Verfahren beruhen.

# 1. Herstellung einer cDNA, wenn nur die Proteinsequenz bekannt ist

Es kommt häufig vor, daß nur die Aminosäuresequenz oder Teile der Aminosäuresequenz eines Proteins bekannt sind, jedoch nicht die cDNA oder genomische Sequenz. Wegen der Degeneration des genetischen Codes ist es in der Regel nicht möglich, das entsprechende Gen direkt über eine PCR einer geeigneten cDNA-Bank zu amplifizieren. Man sucht daher Regionen, in denen Aminosäuren wie Tryptophan, Methionin bzw. Asparagin, Aspartat, Glutamat, Glutamin, Tyrosin, Phenylalanin, Cystein oder Lysin gehäuft auftreten, da es für diese Aminosäuren nur ein bzw. zwei Codons gibt. Sofern es gelingt, mit niedrig degenerierten Primern ein PCR-Fragment der erwarteten Größe zu erhalten, wird dieses als Sonde benutzt, um das dazugehörige Gen aus einer cDNA-Bank zu klonieren. Diese Arbeit wird zwar heutzutage durch die Verfügbarkeit von Gene-Arrays und Klonkollektionen in vielen Fällen wesentlich erleichtert, doch zum einen stehen solche Hilfsmittel nur für eine begrenzte Anzahl von Organismen und Zelltypen zur Verfügung, zum anderen ist selbst bei Vorliegen der kompletten cDNA meist noch eine Umklonierung in einen geeigneten Expressionsvektor erforderlich. Der Zeitaufwand kann je nach Schwierigkeit des Projekts bei ein bis zwei Wochen, in Extremfällen aber durchaus auch bei mehreren Monaten bis Jahren liegen. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann ausgehend von einer bekannten Proteinsequenz ein Expressionskonstrukt mit einem für den gewünschten Organismus optimierten Codon Usage in ein bis zwei Tagen hergestellt werden. Hierfür muss der Organismus, in dem das Protein natürlicherweise exprimiert wird, gar nicht zur Verfügung stehen, da die DNA-Sequenz aus der bekannten Proteinsequenz abgeleitet werden kann, ohne daß ein Template vorliegen muss. Mit verbesserten Proteinsequenzierungsmethoden wird es in Zukunft möglich sein, Proteine mit interessanten Enzymaktivitäten aus beliebigen Organismen zu sequenzieren und ohne den Umweg über die cDNA-Klonierung mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens direkt in jedes gewünschte Expressionssystem zu überführen.

18

PCT/DE00/01863

## 2. Herstellung von Designergenen und Designerproteinen

5

10

Eine weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die einfache Herstellung von Designergenen bzw. Designerproteinen, d.h. die Kopplung funktioneller Domänen verschiedener Proteine, um beispielsweise Enzyme mit neuen oder veränderten Eigenschaften herzustellen. Bei Kenntnis der Röntgenkristallstruktur eines Proteins können dann sehr gezielte Veränderungen wie z.B. die Einfügung definierter Linkerdomänen oder ein Redesign einer Bindungstasche vorgenommen werden, um neue Funktionen oder veränderte Spezifitäten in Proteine einzuführen. Durch zielgerichtetes Proteindesign kann man beispielsweise regulierbare katalytische Zentren konstruieren, die durch eine Konformationsänderung des Proteins infolge der Bindung eines spezifischen Liganden aktiviert werden. Auf diese Weise können Designerproteine hergestellt werden, die z.B. auf die Bindung eines bestimmten Virusproteins hin eine Caspase-Aktivität entfalten, die dann in infizierten Zellen Apoptose auslöst. Erste Versionen solcher hochspezifischen Pharmaka sind bereits beschrieben worden; vgl. Vocero-Akbani A.M., Heyden N.V., Lissy N.A., Ratner L., Dowdy S.F., Nat Med, 1999 Jan, 5:1, 29-33. Weiterhin können Proteine dadurch stabilisiert werden, daß an bestimmten Positionen Aminosäuren eingebaut werden, die zusätzliche Salzbrücken bilden können. Somit kann die Toleranz gegenüber hohen Temperaturen verbessert werden, was unter anderem für die Waschmittelindustrie vorteilhaft ist. Sofern die Domänstrukturen bekannt sind, kann durch die punktgenaue Expression bestimmter funktioneller Regionen eine gewünschte enzymatische Aktivität von einer unerwünschten getrennt werden. Ebenso lassen sich Multienzymkomplexe konstruieren, die eine ganze Reihe verschiedener Reaktionen katalysieren können. Dadurch lassen sich Verbesserungen bei der Synthese vieler organischer Verbindungen erreichen oder manche Synthesen sogar erst ermöglichen. Dies eröffnet ganz neue Perspektiven, da viele organische Synthesen, bei denen heute noch umweltgefährdende Lösungsmittel und Katalysatoren eingesetzt werden müssen, in Zukunft durch solche maßgeschneiderten Biokatalysatoren ersetzt werden können.

# 3. Systematische Mutagenese als Ersatz für randomisierte Mutagenisierung

Eine häufig vorkommende Aufgabe in der biochemisch orientierten Molekularbiologie besteht darin, aus vielen Proteinvarianten diejenige herauszusuchen, die die höchste enzymatische Aktivität oder die stärkste Bindung an ein Substrat oder ein anderes Protein aufweist. Man geht dann meist so vor, daß man eine Reihe von zufälligen Mutationen von einer oder mehreren Aminosäuren einführt und die entstehenden Varianten in einem geeigneten Screening-Verfahren analysiert. Zwar ist es prinzipiell auch möglich, alle Mutanten separat herzustellen, jedoch wird dies aus Zeit- und Kostengründen selten durchgeführt. Bei einer randomisierten Mutagenisierung ist die Kontrolle über die entstehenden Mutanten naturgemäß sehr limitiert, zum einen da bestimmte Aminosäuresubstitutionen verfahrensbedingt häufiger gefunden werden als andere, zum anderen, da es sich kaum vermeiden lässt, daß bei diesem Verfahren auch Stopcodons eingeführt werden. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren lassen sich hingegen alle gewünschten Mutanten gezielt und ohne großen Aufwand darstellen und als Proteine exprimieren.

15

20

25

10

5

# 4. Herstellung synthetischer Gene, insbesondere zum Einsatz als DNA-Vakzine

In vielen Fällen ist es wünschenswert, die Proteinexpression bestimmter Gene in heterologen Systemen zu optimieren. Dies kann durch die Verwendung starker Promotoren sehr häufig nur zum Teil erreicht werden. Je nachdem, welcher Organismus für die Expression verwendet wird, kann sich die Verwendung bestimmter Codons für eine Aminosäure vorteilhaft oder nachteilhaft auf die erreichbare Genexpression auswirken. So sind beispielsweise viele retrovirale Genprodukte in eukaryotischen Zellen nur schlecht translatierbar, da sie meist sehr AT-reich sind und in höheren Eukaryonten seltene Codons benutzen. Speziell für den Einsatz solcher Gensequenzen als DNA-Vakzine ist es daher von großem Vorteil, wenn deren Codongebrauch für Säugerzellen optimiert ist. Desgleichen können bestimmte RNA-Strukturen zu einer Instabilität der Transkripte führen, was die Genexpression ebenfalls negativ beeinflussen kann. Solche Elemente können durch Codonveränderungen mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ebenfalls leicht ausgeschaltet werden.

# 30 5. Analyse von Proteindomänen durch Deletions- oder Punktmutagenese

Die Analyse von Mutanten ist sehr oft das Mittel der Wahl bei der funktionellen Charakterisierung von Proteinen. Zwar existiert sowohl für die Herstellung von Deletions- wie auch

Punktmutanten eine Reihe etablierter Verfahren, jedoch sind diese in der Regel sehr zeitaufwendig und arbeitsintensiv. Deletionen werden meist durch Einführen von Linkersequenzen oder durch eine PCR mit Primern, deren Enden zu verschiedenen Teilsequenzen komplementär sind, hergestellt. Um eine ganze Serie definierter Deletionen zu erhalten, ist häufig ein Zweischrittverfahren notwendig, bei dem zunächst bestimmte Restriktionsschnittstellen eingeführt werden, über welche dann die gewünschten Deletionen eingeführt werden können. Mit entsprechend konzipierten Primern und einer Mehrfragmentligation lassen sich solche Deletionen zwar im Prinzip auch in einem Schritt herstellen, jedoch sind die Erfolgsaussichten dabei eher gering. In allen diesen Fällen muss die Wildtyp-DNA als Template vorliegen, was bei dem erfindungsgemäßen Verfahren nicht notwendig ist. Darüber hinaus können Deletionsmutanten hergestellt werden, da es gar nicht notwendig ist, Restriktionsschnittstellen einzuführen, für die man erst geeignete Stellen finden muss, damit die eingeführten Mutationen keine Veränderungen in der Proteinsequenz bewirken (sogenannte "Silent site" Mutationen). Auch die Herstellung von Doppel- oder Tripletmutanten ist mit dem erfindungsgemäßen Verfahren möglich. Für die funktionelle Kartierung eines Proteins können in dessen Gensequenz mittels der erwähnten "Silent site" Mutationen gleichzeitig auch Restriktionsschnittstellen für eine große Anzahl verschiedener Restriktionsendonukleasen eingeführt werden, mit deren Hilfe beliebige Deletionen hergestellt werden können. In vielen Fällen wird daher die klassische Mutationsanalyse verzichtbar und kann durch das schnellere und genauere erfindungsgemäße Verfahren ersetzt werden.

10

15

20

# 6. Gekoppelte in vitro Transkriptions/Translationssysteme ("EasyPro<sup>TM</sup>")

Gekoppelte in vitro Transkriptions/Translationssysteme werden zur schnellen Synthese von Proteinen im analytischen Maßstab eingesetzt, z.B. für Bindungsstudien Kopräzipitationsassays. Hierfür werden die zu exprimierenden Sequenzen in einen Vektor kloniert, der einen Promoter für eine RNA-Polymerase enthält. Mit Hilfe dieser Polymerase wird mRNA transkribiert, die in einem RNA-depletierten Weizenkeim- oder Retikulozytenextrakt in das gewünschte Protein translatiert wird, das aufgrund der geringen Ausbeute und der einfacheren Nachweisbarkeit meist mit 35S-Methionin oder Cystein radioaktiv markiert ist. Eine noch schnellere Alternative ist das auf dem erfindungsgemäßen Verfahren basierende EasyPro<sup>TM</sup>-System. In einem Anchor-Oligonukleotid, welches einen T7 (SP6) Promoter, eine interne Ribosomenbindungsstelle sowie ein Hexahistidin-Tag enthält, wird durch Restriktion mit

PCT/DE00/01863

XcmI ein einzelner Thymidinüberhang erzeugt, der direkt mit einem PCR-Produkt ligiert werden kann. Drei EasyPro<sup>TM</sup>-Anchor-Oligonukleotide mit verschiedenen Leserastern sind ausreichend, um alle in der richtigen Orientierung ligierten PCR-Fragmente zu translatieren. Mittels terminaler Transferase oder durch Ligation eines entsprechenden Splinker-Oligonukleotids an das 3'-Ende des PCR-Produkts kann man zudem leicht einen künstlichen poly-A-Schwanz in das DNA-Template einführen, welcher das RNA-Transkript stabilisiert und dadurch für eine höhere Translationseffizienz sorgt. Ferner können die für das gewünschte Protein codierenden DNA-Sequenzen nach Spaltung mit einer Restriktionsendonuklease auch direkt an einen modifizierten EasyPro<sup>TM</sup>-Anchor mit einem passenden 4 nt langen Überhang ligiert werden.

10

15

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Minireaktors zur schnellen Synthese von Proteinen. In der unteren Reaktionskammer des Minireaktors findet die Transkription der an Streptavidin-beschichtete Beads gekoppelten Expressions-Anchor-Nukleinsäuresequenz statt. Die dabei entstehenden mRNAs werden über ihren 3'-poly-A-Schwanz an Oligo-dT gekoppelte Beads gebunden, welche sich ebenfalls in der unteren Reaktionskammer befinden. Dort läuft auch die Translation der mRNAs in einem Retikulozytenextrakt ab. Diese Kammer wird durch eine Ultrafiltrationsmembran mit einem MWCO (Molekulargewichtsausschluss) von ca. 200 kD von einer darüber liegenden zweiten Kammer abgetrennt. Diese enthält Beads, welche das Protein von Interesse binden können (z.B. Ni<sup>2+</sup>-NTA-Beads für Proteine mit einem Hexahistidin-Tag). Durch eine kontinuierliche Zufuhr von Pufferlösung mit frischen niedermolekularen Reaktanden (Aminoacyl-tRNAs, Ribonukleotidtriphosphate, CAP-Analogon und Creatinphosphat) wird die Produktion über längere Zeit hinweg aufrechterhalten. Gleichzeitig wird dadurch das synthetisierte Protein aus der unteren in die obere Reaktionskammer gedrückt, wo es an den Beads hängen bleibt. Alternativ kann diese Kammer durch eine weitere Ultrafiltrationsmembran abgeschlossen werden, deren Ausschluß so gewählt ist, daß sie für Puffer und kleinere Moleküle, nicht aber für das gewünschte Protein permeabel ist. Dieses sammelt sich daher in der oberen Kammer an und kann von dort in aufgereinigter Form isoliert werden. Die dabei erzielbaren Ausbeuten sind nicht nur für die meisten analytischen Experimente ausreichend, sondern können sogar Proteinexpressionsexperimente im kleinen Maßstab ersetzen. Wenn es beispielsweise darum geht, die spezifische enzymatische Aktivität verschiedener Proteinmutanten zu bestimmen, mussten diese hierfür bislang in aufwendigen Vorversuchen kloniert, exprimiert und aufgereinigt werden. Da praktisch alle diese Schritte in dem erfindungsgemäßen EasyPro™-Verfahren bereits integriert sind, wird dadurch ein erheblicher Zeitvorteil gegenüber konventiellen Methoden erreicht.

22

PCT/DE00/01863

Mit einer Modifikation des vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahrens können einfach und kostengünstig Peptidbibliotheken hergestellt werden, welche unter anderem zum Epitopmapping von Antikörpern oder zur Identifizierung immunogener Epitope in Proteinen von Viren, Bakterien oder Pilzen benötigt werden (zur schnellen Etablierung serologischer Nachweissysteme). Hierfür werden modifizierte EasyPro<sup>TM</sup>-Anchor-Oligonukleotide sukzessive 10 durch Splinkerligationen verlängert, so daß die für die gewünschten Peptide codierenden Sequenzen entstehen. Im letzten Schritt wird ein vorgefertigter Endsplinker anligiert, welcher für ein C-terminales Tag, ein Stopcodon sowie einen Poly-A-Schwanz codiert. Die Ligationsprodukte werden in dem beschriebenen Minireaktor transkribiert und translatiert. Die fertigen Peptide werden nach Abschluss der Translation und mehreren Waschschritten mit einer 15 spezifischen Protease, z.B. Enterokinase oder Faktor Xa, an der vom EasyPro™-Anchor-Oligonukleotid codierten Schnittstelle abgespalten und aus der oberen Reaktionskammer ausgewaschen. Mit Hilfe des C-terminalen Tags können diese an eine feste Phase für nachfolgende Tests gebunden werden. Die Peptide liegen zudem schon in aufgereinigter Form vor und können direkt für nachfolgende Applikationen eingesetzt werden. Da jeweils das gleiche 20 Anchor-Oligonukleotid verwendet wird und die benötigten Splinker-Oligonukleotide aus einem bereits vorgefertigten Teilstück in wenigen Schritten aufligiert werden können, sind die anfallenden Kosten geringer als bei einer konventionellen Peptidsynthese.

# 7. Herstellung von Ribozymen oder Aptameren

25 Analog zu der oben beschriebenen Proteinsynthese lassen sich Anchor-Oligonukleotide mit einem T7 (SP6) Promoter auch zur Herstellung und Mutagenisierung von RNAs verwenden. Das System eignet sich insbesondere zur Synthese verschiedener Ribozyme, da die für die Ribozyme codierenden DNA-Sequenzen auf einem verlängerten Splinker-Oligonukleotid an ein Promotormodul auf einem Anchor-Oligonukleotid anligiert werden können. Vor allem können 30 genau definierte Ribozymtemplatebibliotheken erstellt werden, die sich per PCR leicht amplifizieren erfindungsgemäßen lassen. Mit dem Verfahren können Ribozymtemplatesequenzen auf das Nukleotid genau hergestellt werden, ohne daß hierfür

15

20

25

30

WO 00/75368

23

PCT/DE00/01863

Klonierungsarbeiten notwendig sind. Durch Einführung von Linksequenzen kann man Ribozyme herstellen, die sich über eine zur Linksequenz komplementäre DNA/RNA an eine beliebige chemische Verbindung wie Peptide, Nukleinsäuren, aliphatische Kohlenwasserstoffe, Ester, Ether oder Alkohole koppeln lassen. Wenn diese Verbindung an eine feste Phase gebunden vorliegt, lassen sich Ribozyme selektionieren, die diese Bindung spalten. Diejenigen Ribozyme, die sich selbst von der Bindung an die feste Phase "befreit" haben, können durch reverse Transkription und nachfolgende asymmetrische PCR in einzelsträngige DNA-Moleküle überführt werden. Diese werden dann über die Linksequenz an ein entsprechend modifiziertes Anchor-Oligonukleotid hybridisiert und ligiert. Das verwendete Anchor-Oligonukleotid ist so konstruiert, daß es einen T7-Promoter enthält, über den mit Hilfe der T7-Polymerase wieder das Ribozym erhalten werden kann. Durch die Verwendung einer ungenauen Reversen Transkriptase (z.B. HIV RT) lassen sich zufällige Mutationen einführen. Der Selektionsdruck kann durch immer kürzere Inkubationen erhöht werden, so daß präferentiell Ribozyme mit einer hohen Aktivität amplifiziert werden. Analog lassen sich nach demselben Prinzip auch Ribozyme mit der Fähigkeit selektionieren, eine Bindung zur festen Phase zu vermitteln.

#### 8. Verwendung von mit dem erfindungsgemäßen Verfahren produzierten ssDNAs in der Diagnostik (PathoCheckTM)

Bei der Diagnostik von Infektionskrankheiten wird üblicherweise häufig ein direkter Erregernachweis z.B. durch PCR verlangt. Besonders in der Transfusionsmedizin ist es wichtig, kontaminierte Blutproben sicher zu erkennen und auszusortieren. Die hierfür üblicherweise eingesetzten serologischen Assays können dies nur dann gewährleisten, wenn die Infektion des Spenders bereits einige Zeit zurückliegt, so daß bereits Antikörper gebildet worden sind. Während eines Fensters von bis zu 12 Wochen (in Extremfällen auch länger) sind beispielsweise bei der HIV-Infektion noch keine Antikörper im Blut nachweisbar, obwohl bereits eine massive Virusreplikation stattfindet. Da eine routinemäßige PCR-Untersuchung aller Proben aus Kostengründen vielerorts kaum machbar ist, wird diese (wenn überhaupt) an Pools von Einzelspenden durchgeführt. Die Problematik dabei ist, daß dadurch die an sich sehr hohe Sensitivität sinkt, da die Menge des für die Analyse eingesetzten Materials nicht beliebig erhöht werden kann. Bei Viruserkrankungen wie HIV, bei denen ein Großteil der Viren extrazellulär vorliegt, kann dies durch eine Konzentrierung der Viren durch Zentrifugation noch einigermaßen ausgeglichen werden, bei vorwiegend zellassoziierten Viren funktioniert das allerdings meist WO 00/75368

weniger gut. Man kann zwar zunächst DNA oder RNA aus den Blutzellen isolieren, jedoch nur einen Bruchteil davon in der PCR-Reaktion einsetzen, da sonst unspezifische PCR-Produkte überhandnehmen. Daher muss in solchen Fällen eine Vorselektion des zu amplifizierenden Materials durchgeführt werden. Hierfür wird ein einzelsträngiges, mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestelltes Produkt eingesetzt, das mit einem modifizierten Anchor-Oligonukleotid hergestellt wird. In diesem Fall verwendet man ein Anchor-Oligonukleotid aus zwei getrennten komplementären Strängen, von denen der eine am 5'-Ende modifiziert, z.B. biotinyliert, ist, der andere am 3'-Ende blockiert ist. Nach der Synthese der Virus-Sequenz wird der nichtbiotinylierte Strang durch Waschen mit einer denaturierenden Lösung abgetrennt, so daß eine einzelsträngige Antisense-DNA verbleibt. Diese kann mit dem 5'-biotinylierten Teil-Anchor-Oligonukleotid und einem endständigen Oligonukleotid amplifiziert werden, sofern mehr Material benötigt wird. Von diesem PCR-Produkt ist nur ein Strang biotinyliert, der andere kann durch Denaturierung abgetrennt werden. Diese Antisense-DNA kann nun dafür eingesetzt werden, um virale RNAs oder DNAs aus einem komplexen Gemisch wie einem Zelllysat oder einer Nukleinsäurepräparation anzureichern, indem man diese miteinander hybridisiert, die Hybride an einen Streptavidin-beschichteten Träger (Support) bindet und nicht-hybridisierte Komponenten unter stringenten Bedingungen wegwäscht. In einem zweiten Schritt können die angereicherten RNAs oder DNAs dann mit einer konventionellen PCR mit Primern aus dem nicht-hybridisierten Teil der RNA oder DNA amplifiziert und nachgewiesen werden. Dies kann üblicherweise über Gelelektrophorese der Produkte geschehen oder durch Fluoreszenzanalyse oder durch einen nachgeschalteten ELISA, unter der Voraussetzung, daß ein entsprechend modifizierter Primer verwendet wurde. Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens sind, daß fast beliebig hohe Mengen an Ausgangsmaterial eingesetzt werden können, was die Sensitivität der Analyse verbessert, daß auch mehrere Targets gleichzeitig untersucht und bei Verwendung verschieden fluoreszenzmarkierter Primer auch differenziert werden können und daß es für beliebige Pathogene wie Bakterien, Pilze oder Viren einsetzbar ist. Durch die Voranreicherung der zu amplifizierenden Sequenzen werden nebenbei auch Hintergrundprobleme deutlich reduziert. Bei entsprechender Miniaturisierung kann eine große Anzahl verschiedener Pathogene gleichzeitig auf einem Chip getestet werden, wodurch die Analysekosten extrem gesenkt werden können.

## 9. "Gene Profiling" (GPro<sup>TM</sup>)

WO 00/75368

PCT/DE00/01863

In der molekularbiologischen Forschung und zunehmend auch in der molekularen Diagnostik wird die Expression bestimmter Gene auf der RNA-Ebene quantitativ untersucht. Standardwerkzeuge hierfür sind der Northern-Blot, das S1-Mapping oder der "Ribonuclease Protection Assay" (RPA), meist in Verbindung mit radioaktiv markierten Sonden. Die vorstehend beschriebenen einzelsträngigen DNAs können auch für diese Aufgabe verwendet werden. Eine vorhergehende Aufreinigung der zu analysierenden RNAs, die meist eine zusätzliche Fehlerquelle darstellt, ist hierzu nicht notwendig. Ähnlich wie bei dem erfindungsgemäßen PathoCheck<sup>TM</sup>-Verfahren werden die zu untersuchenden mRNAs mit einem Überschuss eines modifizierten z.B. biotinylierten Anchor-Oligonukleotids mit genspezifischen einzelsträngigen Antisense-DNAs hybridisiert und an einer z.B. Streptavidin-beschichteten festen Phase 10 immobilisiert. Nach dem Auswaschen aller Proteine, nicht relevanter Nukleinsäuren und sonstiger Verunreinigungen werden die Ziel-mRNAs mit einer Reihe von direkt oder indirekt fluoreszenzmarkierten Splinkersequenzen, welche zu einem anderen Teil dieser mRNAs komplementär sind, nachgewiesen. Durch die Verwendung verschiedener genspezifischer Antisense-DNAs und unterschiedlich markierter Nachweissplinker-Oligonukleotide kann die 15 Expression mehrerer Gene gleichzeitig analysiert werden. Das ganze Verfahren lässt sich ohne großen Aufwand vollständig automatisieren. Sofern die zu analysierenden Gewebe nicht übermäßig viel RNase enthalten, reicht eine Lyse in chaotropen Puffern und/oder Zugabe von RNasin aus, die Integrität der RNAs zu gewährleisten. Wenn maximale Sensitivität wichtiger ist als der gleichzeitige Nachweis verschiedener mRNAs in einem Reaktionsansatz, können anstelle 20 der fluoreszenzbasierten Nachweisreagenzien auch Antikörper eingesetzt werden, welche an ein polyvalentes Sekundärreagenz binden wie ein anti-Maus-Ig-Peroxidase-Polymer. Diese Komplexe werden dann in einer nachgeschalteten Enzymreaktion detektiert z.B. durch die beim Umsetzen eines geeigneten Substrats entstehende Chemilumineszenz. Für besonders häufig gemachte Untersuchungen können entsprechende GProTM-Kits mit synthetischen Kontroll-25 mRNAs als quantitative Standards bereits fertig konfektioniert werden.

# Allelidentifizierung durch hybridvermittelte Ligation (LIMA™; Ligation mediated 10. Identification of Mutant Alleles)

Besonders in der Pränataldiagnostik von Erbkrankheiten, aber auch zur Bestimmung der indi-30 viduellen Sensitivität gegenüber verschiedenen Arzneimitteln muss der Genotyp bestimmter Allele festgestellt werden. In der Regel geschieht dies durch eine PCR-Amplifikation des zu

untersuchenden Lokus aus der genomischen DNA und anschließende Restriktionsanalyse oder Sequenzierung. Im ersten Fall bedingt dies eine gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktionsfragmente, die nicht ohne weiteres automatisierbar ist. Das trifft auch im zweiten Fall zu, sofern nicht mit der Chipsequenzierungsmethode gearbeitet wird, die jedoch noch nicht ausgereift ist. Auch für diesen Aspekt lassen sich erfindungsgemäß hergestellte DNA-Fragmente verwenden. Voraussetzung hierfür ist, daß es sich um bekannte, molekular identifizierte Allele handeln muss. Ein erfindungsgemäß hergestelltes Anchor-Oligonukleotid wird dann so konstruiert, daß es an eine Genregion hybridisiert, die unmittelbar vor der Mutation liegt. Ein weiteres Oligonukleotid, das ein oder mehrere fluoreszierende Markierungen enthält, hybridisiert an die direkt angrenzende 3'-Region des Gens, so daß die beiden freien Enden der erfindungsgemäß hergestellten Anchor-Oligonukleotid-DNA und des fluoreszenzmarkierten Oligonukleotids bei durchgängiger Hybridbildung direkt nebeneinander zu liegen kommen und miteinander ligiert werden können. Sofern die Sequenz an dieser Stelle abweicht, kommt es nicht zur Anlagerung der Enden und damit auch nicht zur Ligation. Stattdessen kann z.B. ein mit einer anderen Fluoreszenz markiertes Oligonukleotid an die entsprechende mutierte Sequenz binden, wodurch eine andere Markierung an den biotinylierten Anchor ligiert wird. Durch Laseranregung werden die jeweils gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe und damit die jeweiligen Allele identifiziert. Zur Erhöhung der Sensitivität des erfindungsgemäßen Verfahrens kann auch in diesem Fall eine asymmetrische PCR vorgeschaltet werden, welche den zu untersuchenden 20 Lokus amplifiziert. Bei einheitlichen Reaktionsbedingungen für die PCR und Hybridisierung ist es möglich, mehrere verschiedene Allele gleichzeitig aus einer Probe zu bestimmen.

## 11. Direkte Interaktionsanalyse von Protein Arrays (LISPATM)

Mit dem Erfolg des "Human Genome Project" steht als eine der nächsten Aufgaben die Klassifizierung der ca. 50.000 menschlichen Gene an. Nicht nur in der Grundlagenforschung, sondern auch in dem sich rasch fortentwickelnden Gebiet der molekularen Medizin ist es wichtig zu verstehen, was diese Gene tun, wie sie in welchen Situationen miteinander kooperieren, welche Proteine, Peptide oder niedermolekularen Stoffe an welche anderen Proteine binden etc. Ein erster Anhaltspunkt für solche Kooperationen zwischen Proteinen ist meist ein direkter physischer Kontakt der jeweiligen Genprodukte. Um solche Bindungen in vitro auf der Proteinebene untersuchen zu können, benötigt man in der Regel aufgereinigte Proteinpräparationen. Bei 50.000 Proteinen ist dies jedoch nicht ohne weiteres möglich. Man behilft

sich daher zumeist mit genetischen Methoden wie z.B. dem sogenannten "Yeast Two Hybrid Screen", um mögliche Interaktionspartner zu identifizieren. So erfolgreich diese Methode bisher auch eingesetzt worden ist, ist sie dennoch extrem artefaktanfällig, umständlich und für die Komplexität der nun anstehenden Aufgabe ungeeignet. Diese Aufgabe kann mit einer Kombination des erfindungsgemäßen Verfahrens, des Sloning<sup>TM</sup>-Verfahrens, und dem erfindungsgemäßen EasyPro<sup>TM</sup>-Verfahren in Verbindung mit einem Biochip durchgeführt werden. Mittels einer Automatisierung können die kompletten 50.000 Gene synthetisiert, exprimiert und mit einem geeigneten Tag zur Immobilisierung in Reaktionskammern eines Biochips versehen werden. Für Bindungsstudien mit einem fluoreszenzmarkierten Protein oder einer niedermolekularen chemischen Verbindung ist eine Menge von 10<sup>7</sup> bis 10<sup>8</sup> Molekülen üblicherweise ausreichend. In Kavitäten von 100 x 200 x 60 µm können etwa 1 Nanoliter einer Proteinlösung deponiert werden, dies entspricht bei einem 100 kD Protein und einer Konzentration von 5 mg/ml ca. 3 x 10<sup>10</sup> Molekülen. Geht man davon aus, daß die tatsächliche Bindungskapazität pro Kavität bei ca. 1% dieses Werts liegt, ist auch bei relativ großen Proteinen noch ausreichend Material vorhanden. Wenn die einzelnen Kavitäten ca. 30 μm auseinanderliegen, so könnte die gesamte Bibliothek von 50.000 Proteinen auf einem Chip von nur 20 cm² untergebracht werden. Ein Laser mißt die Fluoreszenz in sämtlichen Kavitäten vor und nach der Bindung des fluoreszenzmarkierten Zielmoleküls, woraus man die Stärke der Interaktion berechnt. Kavitäten, in denen nur das Tag präsentiert wird, dienen als unspezifische 20 Kontrolle. Mit Hilfe solcher Proteinarrays lassen sich beispielsweise bislang nicht feststellbare Bindungen von Arzneimitteln an zelluläre Proteine detektieren oder auch komplizierte Signaltransduktionskaskaden nachvollziehen.

# 12. Parallele Analyse von mRNAs mit immobilisierten Nukleinsäure Arrays (PAMINATM)

Einer der Schwerpunkte der modernen Arzneimittelforschung besteht in dem gezielten Eingriff in die Expression einzelner Gene. Dazu muss der Einfluss von neuen Wirkstoffen auf die Expression anderer Gene möglichst umfassend untersucht werden. Bei Signalübertragungsprozessen, der Zelldifferenzierung oder bei krankheitsinduzierten meta-bolischen Veränderungen wird oft eine ganze Kaskade verschiedener Gene an- oder abgeschaltet. Aufgrund der Komplexität der Genexpression in höheren Organismen ist es aber bis jetzt praktisch nicht möglich, mehr als eine Handvoll Gene gleichzeitig zu analysieren. Mit der

Sequenzierung des menschlichen Genoms werden in Zukunft jedoch die Grundvoraussetzungen für eine umfassende parallele Analyse der gesamten Genexpression einer Zelle geschaffen werden. Aus den vorliegenden Sequenzinformationen lassen sich durch computerisierte Sequenzvergleiche zunächst die Regionen in den einzelnen Genen identifizieren, die die geringste Homologie untereinander aufweisen, also den höchsten Grad an Spezifität für das jeweilige Gen. Aus diesen Genabschnitten können genspezifische, einzelsträngige Antisense-Anchor-DNAs abgeleitet werden, die in einem Array auf einem Biochip immobilisiert werden. Die Antisense-Anchor-DNAs können so konzipiert werden, daß die Schmelztemperaturen sämtlicher RNA/DNA-Hybride in einem engen Fenster liegen. Durch Hybridisierung der gesamten RNA, bzw. der polyA+-RNA der zu untersuchenden Zellen an diesen Array unter Bedingungen maximaler Stringenz werden in jeder Kavität des Biochips RNA/DNA-Hybride erzeugt, falls die korrespondierende mRNA exprimiert wird. In einem 2. Schritt werden die immobilisierten Antisense-Anchor-DNAs an dem hybridisierten RNA-Template durch Behandlung mit einer RNaseH Reversen Transkriptase und modifizierten Nukleotiden, die 15 vorzugsweise fluoreszenzmarkiert sind, verlängert. Nach mehreren Waschvorgängen, um nicht inkorporierte Nukleotide abzutrennen, können die cDNA-Reaktionsprodukte analog zu der beschriebenen LISPATM-Technik durch Laserabtastung der einzelnen Kavitäten gemessen werden.

#### 20 Ausführungsbeispiele

25

1. Herstellung der Anchor- und Splinkeroligonukleotide

Die Anchor- und Splinker-Oligonukleotide wurden nach dem von Sinha N.D., Biernat J., McManus J., Köster H., *Nucleic Acids Res*, 1984 Jun, 12:11, 4539-57 beschriebenen Standardverfahren hergestellt oder durch eine Synthese in großem Maßstab, die nacheinander geviertelt wurde oder durch Simultansynthese auf Cellulosemembranen.

# 2. Markierung mit einer Modifikation

Modifikationen in den Oligonukleotiden wurden mit Standardverfahren durchgeführt.

#### 30 3. Kopplung an die Matrix

Zu 10 μl Streptavidin-gekoppelten magnetisierten Beads (MERCK) in einem Gesamtvolumen von 50 μl in 1xTE/1 M NaCl, pH 7.5 wurden 20-200 pmol Biotin-markierte kinasierte Anchor-

29

Oligonukleotide zugesetzt und 30 min bei Raumtemperatur auf einem Roller inkubiert. Anschließend wurden nicht gebundene Anchor-Oligonukleotide durch einen dreimaligen Pufferwechsel von je 500 µl 1xTE, pH 7.5 weggewaschen.

#### 5 3. Erster Ligationsschritt

Die Ligation erfolgte bei 4°C, 16°C, Raumtemperatur bzw. 37°C (Standard 16°C) in einem Volumen von 50 µl in 1 x Ligasepuffer (Boehringer Mannheim) mit 1 bis 5 Einheiten T4 DNA Ligase (Boehringer Mannheim oder New England Biolabs) für 15 bis 60 Minuten. Für die Ligation wurden in der Regel 20 pmol phosphoryliertes Anchor-Oligonukleotid eingesetzt. Am 5'-Ende phosphorylierte Splinker-Oligonukleotide wurden in 1,5 bis 5fachem molaren Überschuß zugegeben. Nach der Reaktion wurden Ligase und nicht-ligierte Splinker-Oligonukleotide durch drei Pufferwechsel von je 500 µl 1xTE, pH 7.5 weggewaschen. Danach wurde zu den gewaschenen Beads 40 µl eines Restriktionsmixes gegeben, der das Splinkerspezifische Restriktionsenzym Eco31I in 1,25x Restriktionspuffer (Puffer A von Boehringer Manheim bzw. Puffer 4 von New England Biolabs) enthielt. Danach wurde wie vorstehend beschrieben gewaschen.

## 5. Zweiter Ligationsschritt

Es wurden vier weitere Ligationen mit weiteren Splinker-Oligonukleotiden nach der unter Punkt 20 4 aufgeführten Vorschrift durchgeführt.

#### 6. Transposition

Nach der 5. Ligation wurde nach dem Waschen ein Mix des Anchor-spezifischen Restriktionsenzyms Esp3I bzw. BpiI in den entsprechenden herstellerspezifischen Puffern hinzugefügt und 30 bis 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Reaktion wurde der komplette Mix mitsamt den abgeschnittenen aufligierten Splinker-Oligonukleotiden entfernt, in einem separaten Reaktionsgefäß 15 Minuten bei 65°C hitzebehandelt, um das Restriktionsenzym zu inaktivieren und sodann in ein weiteres Reaktionsgefäß mit entsprechend aufligierten, an magnetisierte Streptavidin-Beads gekoppelte Anchor-Oligonukleotide ligiert.

30

# 7. Restriktionskontrolle ligierter Fragmente

Zur Kontrolle der korrekten Größe der geschnittenen Splinker-Oligonukleotide wurde ein 5 µl

30

Aliquot der Reaktion auf einem 18%igen 1xTBE-Polyacrylamidgel aufgetrennt, mit 0,01% SYBR-Gold™ in 1 x TBE für 10 min angefärbt und mit UV-Licht sichtbar gemacht. Auf einem solchen Gel können Längenunterschiede von 1-2 Basen erkannt werden.

PCT/DE00/01863 WO 00/75368 31

5

10

15

# Patentansprüche

- Verfahren zur Herstellung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend die Schritte 1.
  - Kopplung eines Oligonukleotids mit einem Ende an eine feste Matrix, wobei die Kopplung über eine Modifikation erfolgt, und das Oligonukleotid eine Erkennungssequenz für ein TypIIS Restriktionsenzym enthält, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet,
    - b) Zugabe eines weiteren, mindestens teilweise doppelsträngigen Oligonukleotids mit einer anderen Erkennungssequenz für ein TypIIS Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, als in Schritt a), wobei dieses Oligonukleotid nicht an die Matrix binden kann
    - d) Ligation der Oligonukleotide aus Schritt a) und b) in der durch die Blockierung der nicht zu ligierenden Enden fest gelegten Orientierung
    - e) Entfernen nicht verbrauchter Reaktanden sowie Enzyme
- e) Spaltung des Ligationsprodukts aus Schritt c) mit einem TypIIS Restriktionsenzym, 20 welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung im Oligonukleotid aus Schritt a) stattfindet,
  - Abtrennen des so verlängerten Nukleinsäuremoleküls vom Reaktionsgemisch.
- 25 2. Verfahren zur Herstellung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend die Schritte
  - bis d) gemäß Anspruch 1,
  - e) Spaltung des Ligationsprodukts aus Schritt c) mit einem TypIIS Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung in der Nukleinsäuresequenz des Oligonukleotids aus Schritt b) stattfindet,
- 30 Abtrennen des Reaktionsgemisches vom in Schritt e) erhaltenen verlängerten Oligonukleotid aus Schritt a),
  - mindestens einmaliges Wiederholen der Schritte b) bis f).

- 3. Verfahren nach Anspruch 2, ferner umfassend
  - h) Spaltung des erhaltenen Nukleinsäuremoleküls mit einem TypIIS Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung im Oligonukleotid aus Schritt a) stattfindet, und gegebenenfalls
- 5 i) Spaltung des erhaltenen Nukleinsäuremoleküls mit einem TypIIS Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung in der Nukleinsäuresequenz des Oligonukleotids aus Schritt b) stattfindet.
- 4. Verfahren nach Anspruch 3, ferner umfassend Abtrennen des erhaltenen Nukleinsäure-10 moleküls vom Reaktionsgemisch.
  - 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das in Schritt b) eingesetzte Oligonukleotid ein durch das Verfahren nach Anspruch 1 bis 4 hergestelltes Nukleinsäuremolekül ist.

15

- 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei nach Schritt c) als Schritt c) eine Exonuklease- und/oder Phosphatase-Reaktion durchgeführt wird.
- 7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei das Reaktionsgemisch des Schrittes c)' nach der 20 Reaktion entfernt wird.
  - 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das Oligonukleotid aus Schritt a) an dem Ende, welches nicht an die Matrix gekoppelt ist, einen Teil einer Erkennungssequenz für ein TypIIS Restriktionsenzym enthält, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, und der andere Teil der Erkennungssequenz für dieses Restriktionsenzym vom Oligonukleotid aus Schritt b) stammt.
  - 9. Verfahren nach Anspruch 1 bis 8, wobei die Modifikation ein Biotinrest, ein Digoxigeninrest, ein Fluoresceinisothiocyanatrest, eine Aminoverbindung oder ein Succinylester ist.

30

25

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei das Oligonukleotid aus Schritt a) und/oder b) über einen Loop verfügt.

- 11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das Oligonukleotid aus Schritt a) über eine Modifikation im Loopbereich an die feste Matrix gekoppelt ist.
- 5 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die feste Matrix ein Kügelchen (bead), vorzugsweise aus Glas oder Polystyrol, ein Objektträger, ein DNA Chip, die Vertiefung einer Mikrotiterplatte (well) oder ein Reaktionsröhrchen ist.
- 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die feste Matrix einen Streptavidin-10 rest, einen anti-Digoxigenin-Antikörper oder anti-Fluoresceinisothiocyanat-Antikörper umfasst.
  - 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei die Oligonukleotide aus Schritt a) und b) an ihren zu ligierenden Enden über zueinander komplementäre Einzelstrangüberhänge verfügen.

- 15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die Einzelstrangüberhänge 1, 2, 3, 4 oder 5 Nukleotide lang sind.
- Verfahren nach Anspruch 1 bis 15, wobei die verschiedenen TypIIS
   Restriktionsendonukleasen durch analog schneidende Ribozyme ersetzt werden
  - 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei das Oligonukleotid in Schritt b) ein PCR-Produkt, ein Plasmidvektor, eine Phagen- oder Virus-DNA, ein künstliches Chromosom oder eine weitere synthetische DNA ist.

25

30

- 18. Kit zur Herstellung einer Nukleinsäuresequenz nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, umfassend
  - a) eine Bibliothek von 1 bis 1.048.576 verschiedenen Oligonukleotiden enthält, wobei die Oligonukleotide über eine Modifikation an einem Ende an eine feste Matrix koppelbar sind und das Oligonukleotid eine Erkennungssequenz oder einen Teil der Erkennungssequenz für ein TypIIS Restriktionsenzym enthält, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet,

- b) eine weitere Bibliothek von 4 bis 1.048.576 verschiedenen Oligonukleotiden enthält, wobei jedes der Oligonukleotide eine Erkennungssequenz für ein TypIIS Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, enthält, dass von dem TypIIS Restriktionsenzym aus a) verschieden ist, und gegebenenfalls den anderen Teil der Erkennungssequenz des Restriktionsenzyms aus Schritt a) enthält,
- c) eine feste Matrix,
- d) Reservoire der für die Herstellung des Nukleinsäuremoleküls benötigten Enzyme und/oder anderer Reagenzien.

15

20

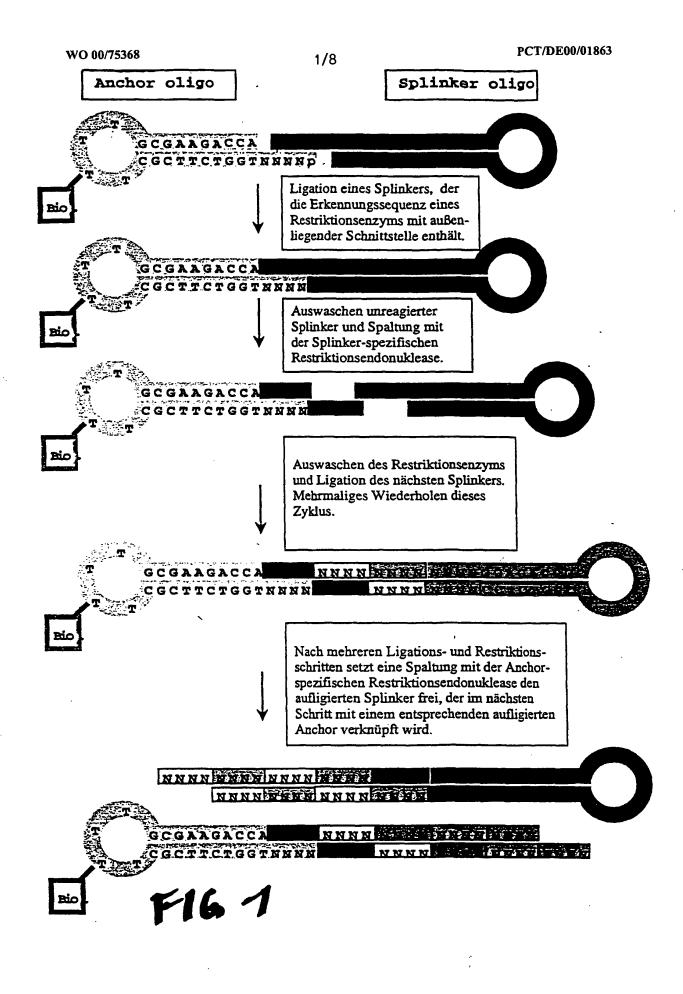
30

5

- 19. Vorrichtung zur automatisierten Herstellung eines Nukleinsäuremoleküls nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch charakterisiert, dass sie
  - a) eine Bibliothek von 1 bis 1.048.576 verschiedenen Oligonukleotiden enthält, wobei die Oligonukleotide über eine Modifikation an einem Ende an eine feste Matrix koppelbar sind und das Oligonukleotid eine Erkennungssequenz oder einen Teil der Erkennungssequenz für ein TypIIS Restriktionsenzym enthält, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet,
  - b) eine weitere Bibliothek von 4 bis 1.048.576 verschiedenen Oligonukleotiden enthält, wobei jedes der Oligonukleotide eine Erkennungssequenz für ein TypIIS Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, enthält, dass von dem TypIIS Restriktionsenzym aus a) verschieden ist, und gegebenenfalls den anderen Teil der Erkennungssequenz des Restriktionsenzyms aus Schritt a) enthält,
  - c) eine feste Matrix,
- d) Reservoire der für die Herstellung des Nukleinsäuremoleküls benötigten Enzyme und/oder anderer Reagenzien, und
  - e) ein Steuerungsprogramm, das einzelne Oligonukleotide aus a) und b) identifizieren, mit der festen Matrix aus c) und den benötigten Enzymen und/oder anderen Reagenzien aus d) zusammenbringen und die Abfolge von Herstellungsschritten bestimmen und durchführen kann.

20. Verwendung des nach einem der vorstehenden Verfahren hergestellten Nukleinsäuremoleküls als DNA-Vakzine, zur Analyse von Proteindomänen, als Matrize für Designerproteine,
zur schnellen Proteinsynthese, zur Herstellung von Ribozymen oder Aptameren, als Sonde zum
Nachweis pathogener Mikroorganismen, als Sonde zum Nachweis der Expression von Genen,
zum Nachweis allelspezifischer Mutationen, zum Nachweis von Protein/Protein-Bindung,
Protein/Peptid-Bindung und/oder der Bindung niedermolekularer Stoffe an Proteine.

		•
		•



		,
		•



Fig. 2

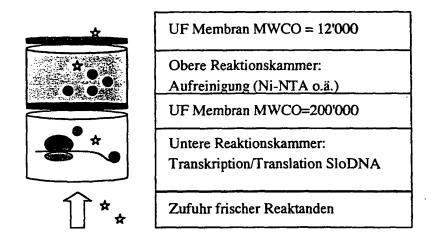
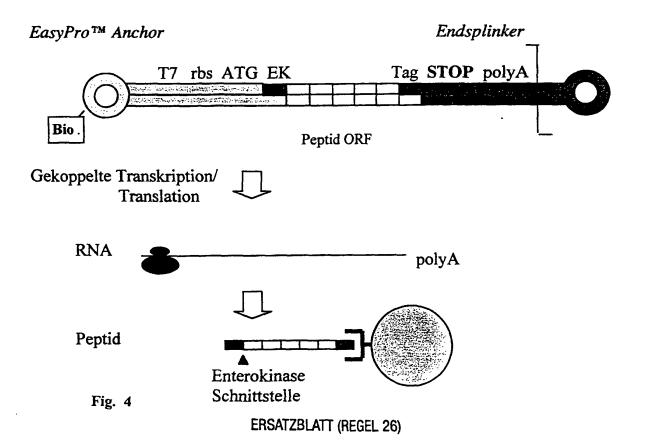


Fig. 3



		•	

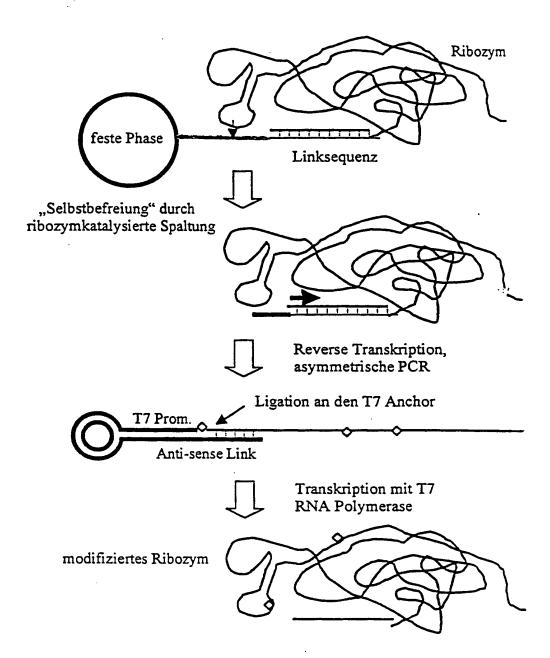
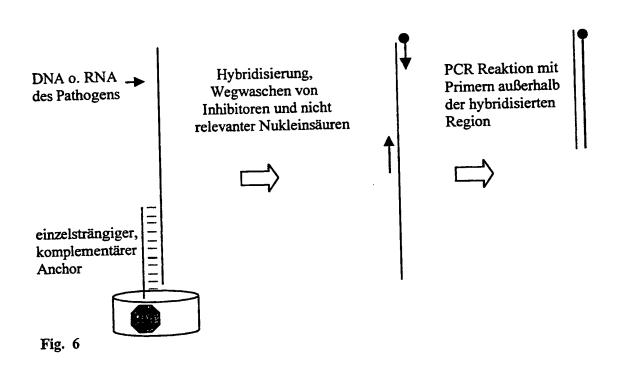
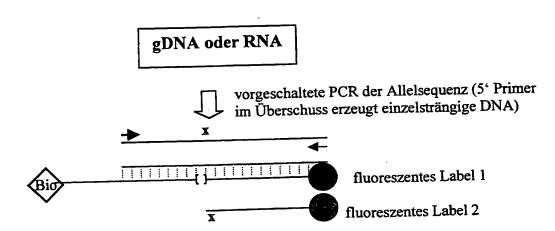


Fig. 5

		٠
		•
		•
		,





Ligation von Anchor und fluoreszenten Splinker (wenn Enden durch Hybridisierung aligniert sind)

Fig. 7

		d
		,
		•

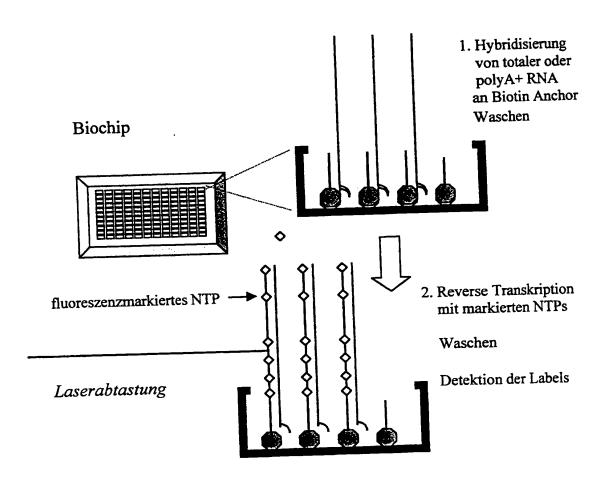


Fig. 8

		٠
		,

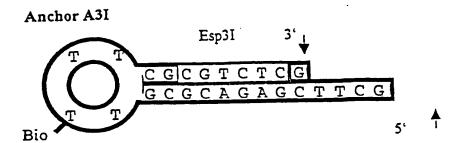


Fig. 9

Anchor A2+

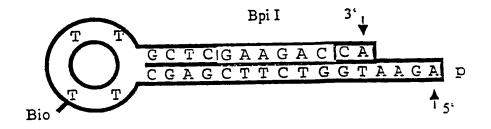


Fig. 10

Bipartite Anchor (Rekonstitution der Esp3I Schnittstelleerst nach Ligation)

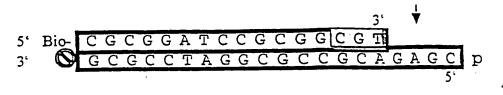


Fig. 11

		i
		,

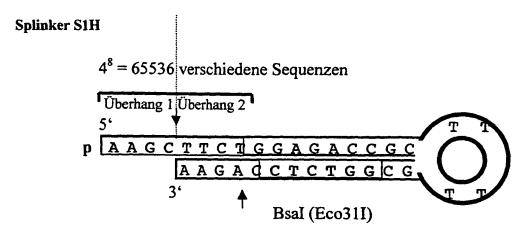


Fig. 12

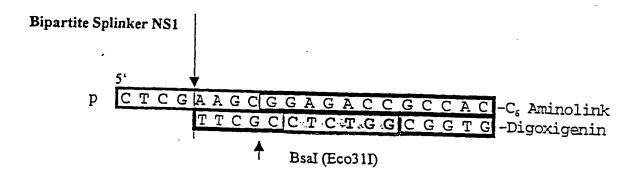


Fig. 13

			•
			•
			•
	·		

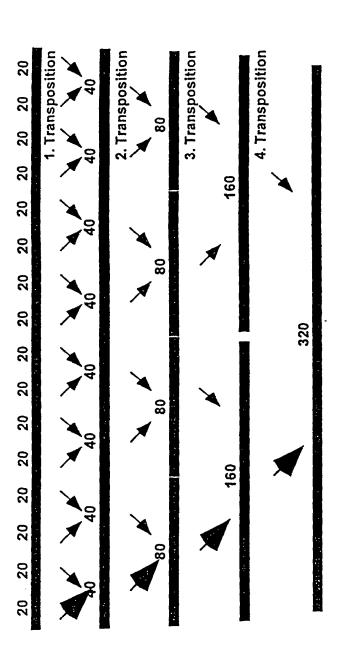


Fig. 14

		•
		.e
		٠

1

# SEQUENZPROTOKOLL

		<110> Diavir GmbH	
	5	<120> Verfahren zur Synthese von DNA-Fragmenten	
		<130> DV-001 PCT	
	10	<140> xx <141> 2000-06-07	
		<150> DE 199 25 862.7 <151> 1999-06-07	
	15	<160> 7	
		<170> PatentIn Ver. 2.1	
	20	<210> 1 <211> 26 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz	
		<220>	
	25	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid	
	30	<400> 1 gcttcgagac gcgttttcgc gtctcg	26
		<210> 2	
		<211> 32 <212> DNA	
	35	<213> Künstliche Sequenz	
	40	<220> <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid	
	10	<400> 2 agaatggtct tcgagctttt gctcgaagac ca	32
	45	<210> 3 <211> 16	
		<212> DNA <213> Künstliche Sequenz	
	50	<220> <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid	
	55	<400> 3 cgcggatccg cggcgt	16
)	60	<210> 4 <211> 20 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz	
		<220> <223> Beschreibung der künstlichen	
	65	Sequenz:Oligonukleotid	

		•
		•
		•

	<400> 4 cgagacgccg cggatccgcg	20
5 10	<210> 5 <211> 34 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz	
10	<220> <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid	
15	<400> 5 aagettetgg agacegettt tgeggtetee agaa	34
20	<210> 6 <211> 20 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz	
25	<220> <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid	
30	<400> 6 ctcgaagcgg agaccgccac	20
35	<210> 7 <211> 16 <212> DNA	
33	<220> <223> Beschreibung der künstlichen	
40	Sequenz:Oligonukleotid <400> 7 gtggcggtct ccgctt	16

		• • •
		•

### (12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum Internationales Büro



## 

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum 14. Dezember 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer WO 00/75368 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation?: C12N 15/10, 15/11, C12P 19/34, C07H 21/00, C12Q 1/68
- (21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE00/01863

(22) Internationales Anmeldedatum:

7. Juni 2000 (07.06.2000)

(25) Einreichungssprache:

Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache:

Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

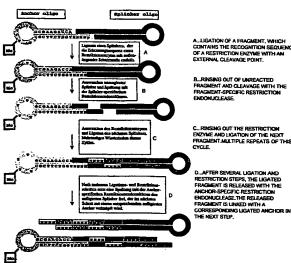
199 25 862.7

7. Juni 1999 (07.06.1999) DI

- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): DIAVIR GMBH [DE/DE]; Steinbergstr. 30, D-85250 Altomünster (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHATZ, Octavian [DE/DE]; Steinbergstr. 30, D-85250 Altomünster (DE).
- (74) Anwälte: BETTENHAUSEN, Berthold usw.; Müllerstrasse 1, D-80469 München (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): DE, JP, US.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

- (54) Title: METHOD FOR THE SYNTHESIS OF DNA FRAGMENTS
- (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR SYNTHESE VON DNA-FRAGMENTEN



(57) Abstract: The invention relates to a method that can be carried out in parallel and automated for the production of any nucleic acid, comprising the following steps: a) coupling an oligonucleotide to a solid matrix; b) adding an additional oligonucleotide; c) performing ligation of the oligonucleotide from steps a) and b) in an orientation; d) removing excess reactants and enzymes from the reaction preparation; e) effecting cleavage of the ligation product from step c) with a restriction system that cleaves outside the recognition sequence, whereby cleavage is effected in the shortened or lengthened oligonucleotide from step a) or in the oligonucleotide from step b); f) separating the reaction mixture from the lengthened or shortened oligonucleotide from step a); g) repeating at least one steps b) to f); h) performing successive sequence-independent linkage of the fragments obtained after executing steps a) to g) until the desired product is obtained.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein parallel ausführbares und automatisierbares Verfahren zur Herstellung einer beliebigen Nukleinsäure, umfassend die Schritte: a) Kopplung eines Oligonukleotids an eine feste Matrix; b) Zugabe eines weiteren Oligonukleotids; c) Ligation der Oligonukleotide aus Schritt a) und b) in einer Orientierung; d) Entfernung überschüssiger

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



### WO 00/75368 A3



#### Veröffentlicht:

Mit internationalem Recherchenbericht.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 17. Mai 2001 Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Reaktanden und Enzyme aus dem Reaktionsansatz; e) Spaltung des Ligationsprodukts aus Schritt c) mit einem ausserhalb der Erkennungssequenz spaltenden Restriktionsenzym, wobei die Spaltung entweder im Oligonukleotid aus Schritt a) oder im Oligonukleotid aus Schritt b) stattfindet; f) Abtrennen des Reaktionsgemisches vom in Schritt e) erhaltenen verlängerten oder verkürzten Oligonukleotid aus Schritt a); g) mindestens einmaliges Wiederholen der Schritte b) bis f); h) sukzessive sequenzunabhängige Verknüpfung der nach Durchführung der Schritte a) bis g) erhaltenen Fragmente bis zum Erhalt des gewünschten Produkts.

nal Application No

PCT/DE 00/01863 A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/10 C12N C12N15/11 C12P19/34 CO7H21/00 C1201/68 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC **B. FIELDS SEARCHED** Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C12P CO7H Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE, LIFESCIENCES C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Category 9 Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to daim No. X WO 95 17413 A (EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH 1-20 ;SCHWIENHORST ANDREAS (DE); LINDEMANN BJOER) 29 June 1995 (1995-06-29) the whole document X EUGEN UHLMANN: "An alternative approach 1-20 in gene synthesis: use of long selfpriming oligodeoxynucleotides for the construction of double-stranded DNA" GENE, vol. 71, 15 November 1988 (1988-11-15). pages 29-40, XP000941756 the whole document Α WO 93 19202 A (US ARMY) 1-7,9,30 September 1993 (1993-09-30) 12-15. 17-19 abstract; claims; figures 1,3 -/--Further documents are listed in the continuation of box C. X Patent family members are listed in annex. Special categories of cited documents: "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance invention "E" earlier document but published on or after the international \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or involve an inventive step when the document is taken alone which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such docudocument referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means ments, such combination being obvious to a person skilled document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "&" document member of the same patent family Date of the actual completion of the international search Date of mailing of the international search report 21 December 2000 16/01/2001

5

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Pilat, D

Intern nal Application No PCT/DE 00/01863

	ntion) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		Relevant to claim No.
A	WO 98 10095 A (BRAX GENOMICS LTD ;THOMPSON ANDREW HUGIN (GB); SCHMIDT GUNTER (GB)) 12 March 1998 (1998-03-12) claims; figures 6A-C,7A-C		1-4,9, 12-15, 18-20
A	WLODEK MANDECKI ET AL.: "A totally synthetic plasmid for general cloning, gene expression and mutagenesis in Escherichia coli" GENE, vol. 94, 28 September 1990 (1990-09-28), pages 103-107, XP000941757 the whole document		
Ρ,Χ	WO 99 47536 A (BERNAUER ANNETTE) 23 September 1999 (1999-09-23) abstract; claims 1-24		1–20
		-	
	·		
	·		



Information on patent family members

Interr nal Application No PCT/DE 00/01863

Patent document cited in search report		Publication date	ŀ	Patent family member(s)	Publication date
WO 9517413	Α	29-06-1995	DE	4343591 A	22-06-1995
WO 9319202	 А	30-09-1993	AU	3798393 A	21-10-1993
			EP	0631636 A	04-01-1995
			JP	7507201 T	10-08-1995
			US	5503995 A	02-04-1996
WO 9810095		12-03-1998	AU	721861 B	13-07-2000
			AU	4027497 A	26-03-1998
			CN	1234076 A	03-11-1999
			EP	0927267 A	07-07-1999
WO 9947536	 А	23-09-1999	DE	19812103 A	23-09-1999
			AU	3699899 A	11-10-1999
			EP	1047706 A	02-11-2000

Intern : lales Aktenzeichen PCT/DE 00/01863

. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES PK 7 C12N15/10 C12N15/11 C12P19/34 C07H21/00 C1201/68 Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C12N C12P C07H IPK 7 Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE, LIFESCIENCES C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Kategorie® Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile Betr. Anspruch Nr. 1-20 WO 95 17413 A (EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH X :SCHWIENHORST ANDREAS (DE); LINDEMANN BJOER) 29. Juni 1995 (1995-06-29) das ganze Dokument EUGEN UHLMANN: "An alternative approach 1 - 20X in gene synthesis: use of long selfpriming oligodeoxynucleotides for the construction of double-stranded DNA" Bd. 71, 15. November 1988 (1988-11-15), Seiten 29-40, XP000941756 das ganze Dokument -/--Siehe Anhang Patentfamilie Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu X entnehmen \*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "E" ätteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer T\u00e4tigkeit beruhend betrachtet werden \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er-scheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach \*&\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist Absendedatum des internationalen Recherchenberichts Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 21. Dezember 2000 16/01/2001 Bevollmächtigter Bediensteter Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentiaan 2 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 Pilat, D



Initial Iales Aktenzeichen
PCT/DE 00/01863

WO 93 19202 A (US ARMY) 30. September 1993 (1993-09-30)  Zusammenfassung; Ansprüche; Abbildungen 1,3  WO 98 10095 A (BRAX GENOMICS LTD ;THOMPSON ANDREW HUGIN (GB); SCHMIDT GUNTER (GB)) 12. März 1998 (1998-03-12) Ansprüche; Abbildungen 6A-C,7A-C  WLODEK MANDECKI ET AL.: "A totally synthetic plasmid for general cloning, gene expression and mutagenesis in Escherichia coli" GENE, Bd. 94, 28. September 1990 (1990-09-28), Seiten 103-107, XP000941757 das ganze Dokument		ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
30. September 1993 (1993-09-30)  Zusammenfassung; Ansprüche; Abbildungen 1,3  WO 98 10095 A (BRAX GENOMICS LTD ;THOMPSON ANDREW HUGIN (GB); SCHMIDT GUNTER (GB)) 12-15, 12. März 1998 (1998-03-12) Ansprüche; Abbildungen 6A-C,7A-C  WLODEK MANDECKI ET AL.: "A totally synthetic plasmid for general cloning, gene expression and mutagenesis in Escherichia coli" GENE, Bd. 94, 28. September 1990 (1990-09-28), Seiten 103-107, XP000941757 das ganze Dokument  ,X WO 99 47536 A (BERNAUER ANNETTE) 23. September 1999 (1999-09-23)	Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht komm	enden Teile	Betr. Anspruch Nr.
WO 98 10095 A (BRAX GENOMICS LTD ;THOMPSON ANDREW HUGIN (GB); SCHMIDT GUNTER (GB)) 12. März 1998 (1998-03-12) Ansprüche; Abbildungen 6A-C,7A-C  WLODEK MANDECKI ET AL.: "A totally synthetic plasmid for general cloning, gene expression and mutagenesis in Escherichia coli" GENE, Bd. 94, 28. September 1990 (1990-09-28), Seiten 103-107, XP000941757 das ganze Dokument  7,X WO 99 47536 A (BERNAUER ANNETTE) 23. September 1999 (1999-09-23)	A	30. September 1993 (1993-09-30)  Zusammenfassung; Ansprüche; Abbildungen		12-15,
synthetic plasmid for general cloning, gene expression and mutagenesis in Escherichia coli" GENE, Bd. 94, 28. September 1990 (1990-09-28), Seiten 103-107, XP000941757 das ganze Dokument  WO 99 47536 A (BERNAUER ANNETTE) 23. September 1999 (1999-09-23)	A	WO 98 10095 A (BRAX GENOMICS LTD ;THOMPSON ANDREW HUGIN (GB); SCHMIDT GUNTER (GB)) 12. März 1998 (1998-03-12)		12-15,
23. September 1999 (1999-09-23)	A	synthetic plasmid for general cloning, gene expression and mutagenesis in Escherichia coli" GENE, Bd. 94, 28. September 1990 (1990-09-28), Seiten 103-107, XP000941757		
	Р,Х	23. September 1999 (1999-09-23)		1-20

## INTERNATIONALEF CHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Interna ses Aktenzeichen
PCT/DE 00/01863

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		itglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9517413	Α	29-06-1995	DE	4343591 A	22-06-1995
WO 9319202	Α	30-09-1993	AU	3798393 A	21-10-1993
			EP	0631636 A	04-01-1995
			JP	7507201 T	10-08-1995
			US	5503995 A	02-04-1996
WO 9810095	Α	12-03-1998	 AU	721861 B	13-07-2000
			AU	4027497 A	26-03-1998
			CN	1234076 A	03-11-1999
			EP	0927267 A	07-07-1999
WO 9947536	Α	23-09-1999	DE	19812103 A	23-09-1999
			AU	3699899 A	11-10-1999
			EP	1047706 A	02-11-2000

.

Jes.

Intern nal Application No PCT/DE 00/01863

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/10 C12N15/11

C12P19/34

C07H21/00

C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

### B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC  $\frac{7}{120}$  C12P C07H .

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE, LIFESCIENCES

C. DOCUM	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 17413 A (EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH; SCHWIENHORST ANDREAS (DE); LINDEMANN BJOER) 29 June 1995 (1995-06-29) the whole document	1-20
X	EUGEN UHLMANN: "An alternative approach in gene synthesis: use of long selfpriming oligodeoxynucleotides for the construction of double-stranded DNA" GENE, vol. 71, 15 November 1988 (1988-11-15), pages 29-40, XP000941756 the whole document	1-20
Α	WO 93 19202 A (US ARMY) 30 September 1993 (1993-09-30) abstract; claims; figures 1,3 -/	1-7,9, 12-15, 17-19

Further documents are listed in the continuation of box C.	Patent family members are listed in annex.
Special categories of cited documents:  'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  'E' earlier document but published on or after the international filing date  'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date ctaimed	<ul> <li>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</li> <li>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</li> <li>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</li> <li>*&amp;* document member of the same patent family</li> </ul>
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
21 December 2000	16/01/2001
Name and mailing address of the ISA  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  NL – 2280 HV Rijswijk  Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Pilat, D

		• •

### INTERNATIONAL RCH REPORT

Intern 1al Application No PCT/DE 00/01863

	NAME DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	PC1/DE 00/01863
C.(Continu Category *	otion) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Calegory		
A	WO 98 10095 A (BRAX GENOMICS LTD ;THOMPSON ANDREW HUGIN (GB); SCHMIDT GUNTER (GB)) 12 March 1998 (1998-03-12) claims; figures 6A-C,7A-C	1-4,9, 12-15, 18-20
A	WLODEK MANDECKI ET AL.: "A totally synthetic plasmid for general cloning, gene expression and mutagenesis in Escherichia coli" GENE, vol. 94, 28 September 1990 (1990-09-28), pages 103-107, XP000941757 the whole document	
Ρ,Χ	WO 99 47536 A (BERNAUER ANNETTE) 23 September 1999 (1999-09-23) abstract; claims 1-24	1-20
	••	

			•
		•	



Information on patent family members

PCT/DE 00/01863

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date	
WO 9517413	Α	29-06-1995	DE	4343591 A	22-06-1995	
WO 9319202	Α	30-09-1993	AU EP JP US	3798393 A 0631636 A 7507201 T 5503995 A	21-10-1993 04-01-1995 10-08-1995 02-04-1996	
WO 9810095	Α	12-03-1998	AU AU CN EP	721861 B 4027497 A 1234076 A 0927267 A	13-07-2000 26-03-1998 03-11-1999 07-07-1999	
WO 9947536	Α	23-09-1999	DE AU EP	19812103 A 3699899 A 1047706 A	23-09-1999 11-10-1999 02-11-2000	

	1	

hales Aktenzeichen

PCT/DE 00/01863 KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES PK 7 C12N15/10 C12N15/11 C12P19/34 C07H21/00 C12Q1/68 Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C12N C12P C07H IPK 7 Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete tallen Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evil. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE, LIFESCIENCES C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile Betr. Anspruch Nr. WO 95 17413 A (EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH 1 - 20X :SCHWIENHORST ANDREAS (DE); LINDEMANN BJOER) 29. Juni 1995 (1995-06-29) das ganze Dokument 1 - 20"An alternative approach X EUGEN UHLMANN: in gene synthesis: use of long selfpriming oligodeoxynucleotides for the construction of double-stranded DNA" Bd. 71, 15. November 1988 (1988-11-15), Seiten 29-40, XP000941756 das ganze Dokument -/--Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu Siehe Anhang Patentfamilie X entnehmen 'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist \*E\* ålteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf Anmeldedatum veröffentlicht worden ist \*X'
\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdalum einer
anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden
soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist ausgeführt) O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach \*&\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist Absendedatum des internationalen Recherchenberichts Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 16/01/2001 21. Dezember 2000 Bevollmächtigter Bediensteter Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Pilat, D

Fax: (+31-70) 340-3016

## INTERNATIONALER CHERCHENBERICHT

0

Intern iales Aktenzeichen PCT/DE 00/01863

Kategorie*	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN  Bezeichnung der Veröffentlichung, soweil erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 93 19202 A (US ARMY) 30. September 1993 (1993-09-30)	1-7,9, 12-15, 17-19
	Zusammenfassung; Ansprüche; Abbildungen 1,3	
1	WO 98 10095 A (BRAX GENOMICS LTD ;THOMPSON ANDREW HUGIN (GB); SCHMIDT GUNTER (GB)) 12. März 1998 (1998-03-12) Ansprüche; Abbildungen 6A-C,7A-C	1-4,9, 12-15, 18-20
	WLODEK MANDECKI ET AL.: "A totally synthetic plasmid for general cloning, gene expression and mutagenesis in Escherichia coli" GENE, Bd. 94, 28. September 1990 (1990-09-28), Seiten 103-107, XP000941757	
	das ganze Dokument 	
, X	WO 99 47536 A (BERNAUER ANNETTE) 23. September 1999 (1999-09-23) Zusammenfassung; Ansprüche 1-24	1-20

		·	
•			
		,	

# INTERNATIONALER CHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Interna ales Aldenzeichen
PCT/DE 00/01863

Im Recherchenberich ngeführtes Patentdokur		Datum der Veröffentlichung		itglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9517413	Α	29-06-1995	DE	4343591 A	22-06-1995
WO 9319202	Α	30-09-1993	AU EP JP US	3798393 A 0631636 A 7507201 T 5503995 A	21-10-1993 04-01-1995 10-08-1995 02-04-1996
WO 9810095	Α	12-03-1998	AU AU CN EP	721861 B 4027497 A 1234076 A 0927267 A	13-07-2000 26-03-1998 03-11-1999 07-07-1999
WO 9947536	Α	23-09-1999	DE AU EP	19812103 A 3699899 A 1047706 A	23-09-1999 11-10-1999 02-11-2000

	* * * * * * *
•	
•	

Translation.



## **PCT**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference S 10002 PCT	FOR FURTHER ACTION	SeeNotificat Examination	tionofTransmittalofInternational Preliminary n Report (Form PCT/IPEA/416)			
International application No.	International filing date (day/n		Priority date (day/month/year)			
PCT/DE00/01863	07 June 2000 (07.0	6.00)	07 June 1999 (07.06.99)			
International Patent Classification (IPC) or r C12Q 1/68	national classification and IPC					
Applicant	SLONING BIOTECHNOL	OGY GMB	SH .			
This international preliminary exam and is transmitted to the applicant a		l by this Interr	national Preliminary Examining Authority			
2. This REPORT consists of a total of	8 sheets, including	ng this cover s	sheet.			
amended and are the basis for 70.16 and Section 607 of the	nied by ANNEXES, i.e., sheets of or this report and/or sheets contains and administrative Instructions undotal of sheets.	ining rectifica	on, claims and/or drawings which have been ations made before this Authority (see Rule			
This report contains indications relations	ating to the following items:					
I Basis of the report	Basis of the report					
II Priority						
III Non-establishment	of opinion with regard to novelt	y, inventive st	ep and industrial applicability			
IV Lack of unity of in	vention					
V Reasoned statemen citations and explain	nt under Article 35(2) with regard nations supporting such statemer	l to novelty, ir it	eventive step or industrial applicability;			
VI Certain documents	cited					
VII Certain defects in t	the international application					
VIII Certain observation	ns on the international application	n				
Date of submission of the demand	Date c	of completion	of this report			
08 January 2001 (08.	01.01)	26 Se	eptember 2001 (26.09.2001)			
Name and mailing address of the IPEA/EP	Autho	rized officer				
Facsimile No.	Teleni	hone No				

Form PCT/IPEA/409 (cover sheet) (July 1998)





## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

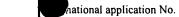
national application No.

PCT/DE00/01863

1. 1	Basis	of the rep	port	
1.	With	regard to	the elements of the international application:*	:
		the inter	national application as originally filed	
	$\overline{\boxtimes}$	the desc	ription:	
		pages	1-30	, as originally filed
		pages		, filed with the demand
		pages	, filed with the letter of	
	$\square$	the clair		
		pages	1= 00	, as originally filed
		pages	, as amended (togethe	er with any statement under Article 19
		pages		, filed with the demand
		pages	1-16 , filed with the letter of	
		•		
	M	the draw		as originally filed
		pages		, as originally filed , filed with the demand
		pages .	, filed with the letter of	
		pages _	, med with the letter of	
	L] t	he sequer	nce listing part of the description:	
		pages -		
		pages		
		pages _	, filed with the letter of	
	the in	nternation	the language, all the elements marked above were available or furnished to the all application was filed, unless otherwise indicated under this item. It is swere available or furnished to this Authority in the following language	nis Authority in the language in which which is:
		the lang	guage of a translation furnished for the purposes of international search (under R	ule 23.1(b)).
		the lang	guage of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).	
		the lang or 55.3)	guage of the translation furnished for the purposes of international preliminary	y examination (under Rule 55.2 and/
3.			to any <b>nucleotide and/or amino acid sequence</b> disclosed in the internation was carried out on the basis of the sequence listing:	ational application, the international
	Ц	contain	ed in the international application in written form.	
i	Ц	filed tog	gether with the international application in computer readable form.	
	닏	furnishe	ed subsequently to this Authority in written form.	
	$\square$	furnishe	ed subsequently to this Authority in computer readable form.	
			atement that the subsequently furnished written sequence listing does no ional application as filed has been furnished.	t go beyond the disclosure in the
			tement that the information recorded in computer readable form is identical rnished.	I to the written sequence listing has
4.		The am	endments have resulted in the cancellation of:	
			he description, pages	
			he claims, Nos.	
			he drawings, sheets/fig	
5.			ort has been established as if (some of) the amendments had not been made, s the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**	ince they have been considered to go
	in thi		heets which have been furnished to the receiving Office in response to an invit as "originally filed" and are not annexed to this report since they do n	
		•	nt sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and anno	exed to this report.

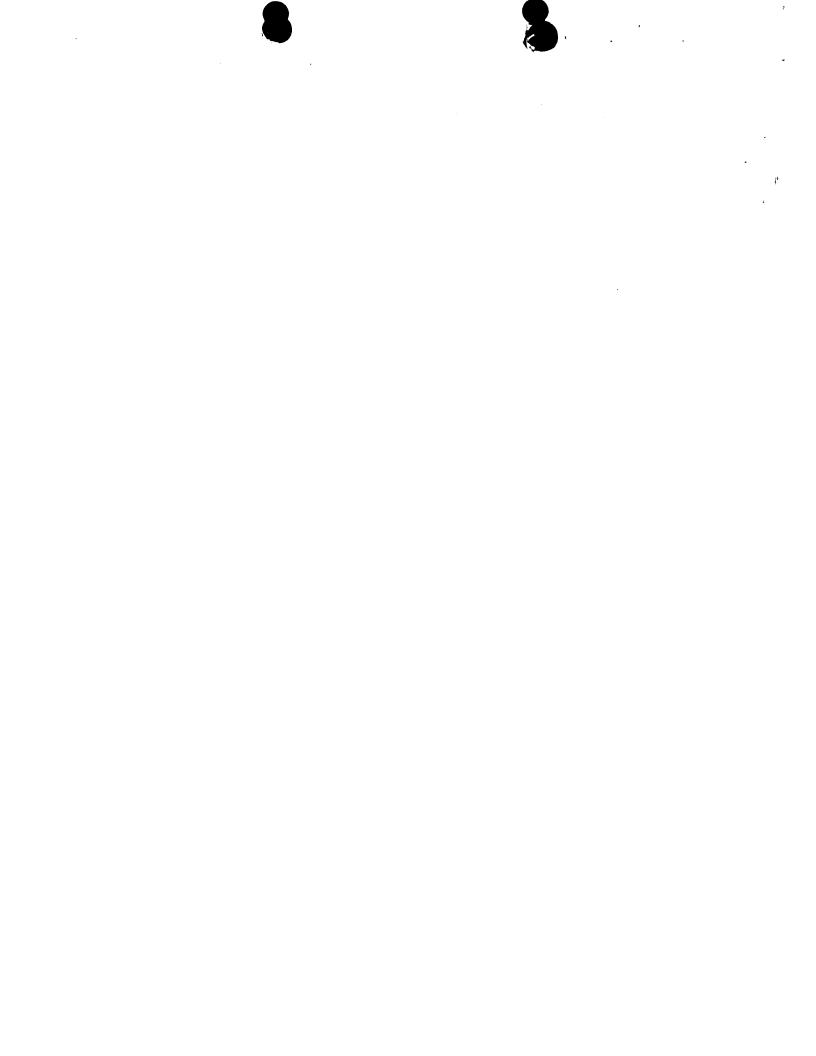




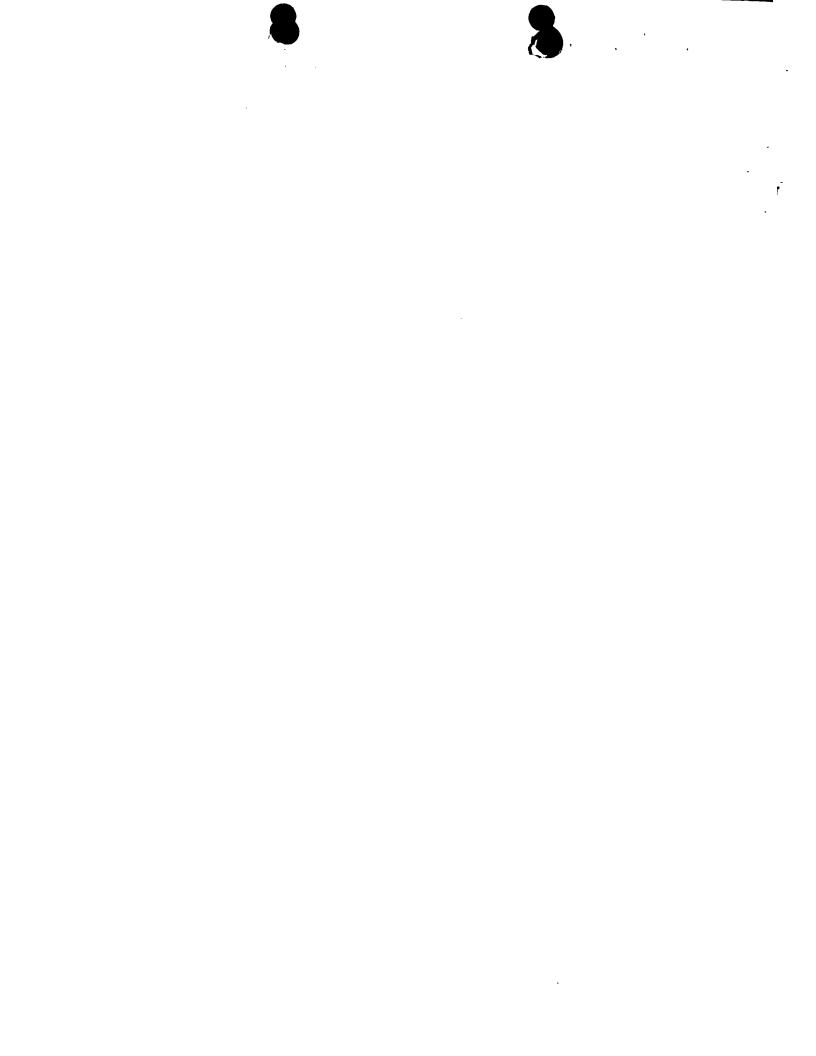


## PCT/DE00/01863

II. Priority
1. This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:
copy of the earlier application whose priority has been claimed.
translation of the earlier application whose priority has been claimed.
This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid.
Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:
SEE SEPARATE SHEET



Statement			
Novelty (N)	Claims	1 - 16	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1 - 16	YES
	Claims		NO NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 16	YES
	Claims		NO
Citations and explanations		<del></del>	
See the Supplement	al Box.		



Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

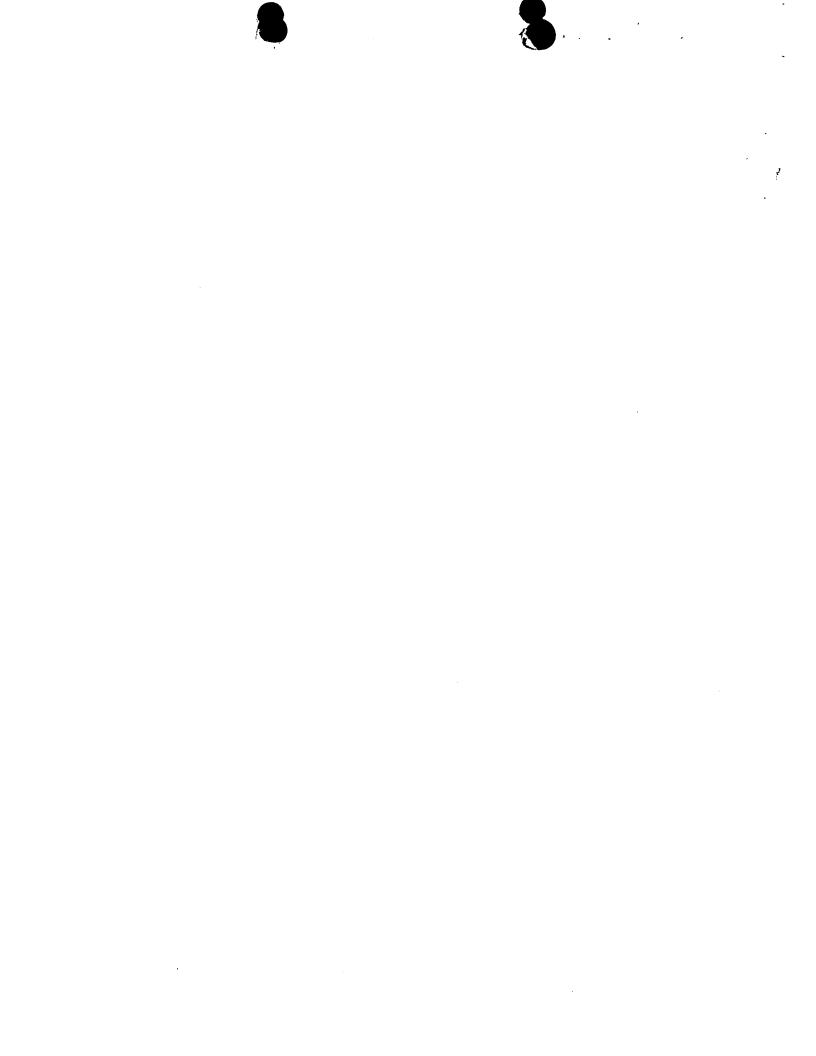
Continuation of: I, II, V

### Box I

### Basis of the report

- This report makes reference to the following documents:
  - D1: WO-A-95/17413 (EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH;
    SCHWIENHORST ANDREAS (DE); LINDEMANN BJOER)
    29 July 1995 (1995-06-29)
  - D2: EUGEN UHLMANN: 'An alternative approach in gene synthesis: use of long selfpriming oligodeoxynucleotides for the construction of double-stranded DNA', GENE, Vol. 71, 15 November 1988 (1988-11-15), pages 29 40, XP000941756
  - D3: WO-A-93/19202 (US ARMY) 30 September 1993 (1993-09-30)
  - D4: WO-A-98/10095 (BRAX GENOMICS LTD; THOMPSON ANDREW HUGIN (GB); SCHMIDT GUNTER (GB)) 12 March 1998 (1998-03-12)
  - D5: WLODEK MANDECKI ET AL.: 'A totally synthetic plasmid for general cloning, gene expression and mutagenesis in Escherichia coli', GENE, Vol. 94, 28 September 1990 (1990-09-28), pages 103 107, XP000941757
  - D6: WO-A-99/47536 (BERNAUER ANNETTE) 23 September 1999 (1999-09-23)
  - D7: WO-A-99/47536
- 2) Amendments (PCT Article 34(2)(b))
- 2.1 The amendments submitted with the letter of 13.9.01 appear to be allowable. They do not appear to go

. . . / . . .



Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: I, II, V

beyond the disclosure in the international application as filed and therefore satisfy PCT Article 34(2)(b).

The basis for the amended Claim 1 is the paragraph bridging pages 7 and 8, page 12, lines 18 - 21 and page 13, lines 10 - 18, as well as Figures 1 and 14.

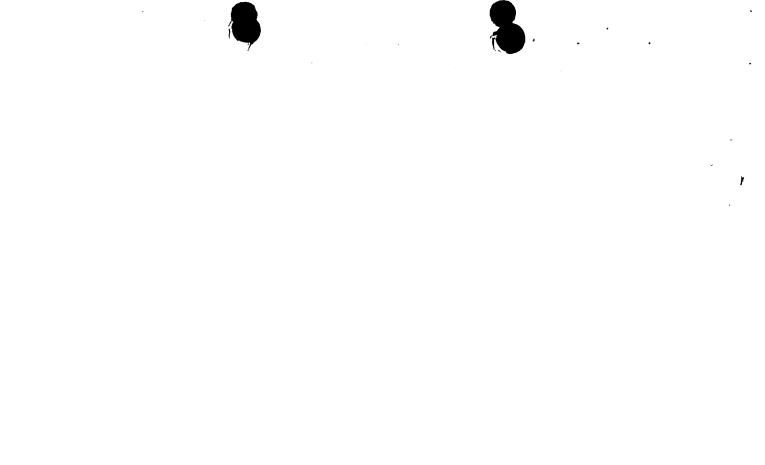
#### Box II

### Priority

- 3.1 The method according to Claim 1 appears to enjoy priority.
- 3.2 The claimed embodiment which relates to an oligonucleotide of step a) that contains <u>part</u> of recognition sequence for a type IIS restriction enzyme as claimed in Claims 5, 15 and 16 is not to be found in the priority document.

These extensions are therefore not directly or inevitably derivable from the priority document. Consequently, the P document is considered to be prior art for Claims 5, 15 and 16 and their dependent claims.

.../...



(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: I, II, V

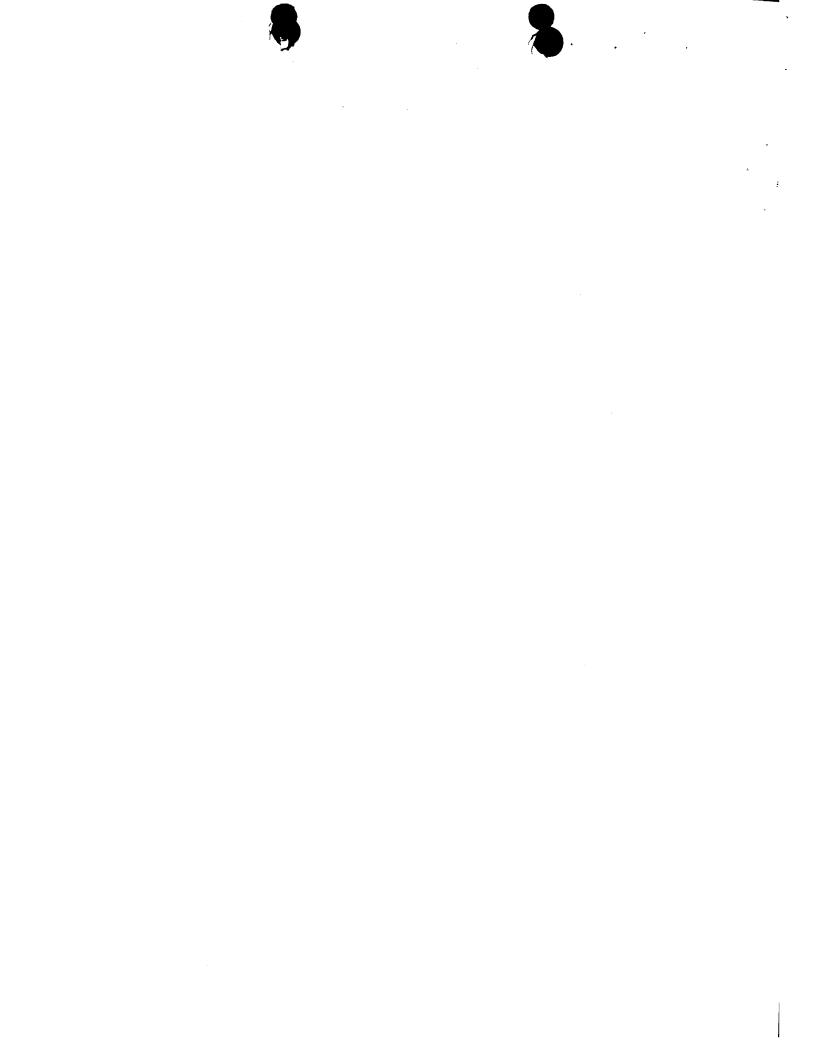
### Box V

Reasoned statement under PCT Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

- 4.1 The method in Claim 1 appears to be novel over D1.
  - D1 does not describe either all the claimed steps or their sequence. Nor does D1 teach that the oligonucleotides produced are used in the parallel method or that two type IIS restriction enzymes must be used in order to force a sequence-independent, orientation-specific ligation.
- 4.2 D2 describes the use of an oligonucleotide which is self-complementary at the 3' end. Those oligonucleotides are filled up to form a double strand by a polymerase activity. The open end is digested by a restriction enzyme and ligated to an end of a vector which has been cut in a matching complementary fashion. The 3' self-complementary end of the ligated oligonucleotide can be digested by a restriction enzyme and ligated to a further oligonucleotide or can be the complementary end of a recirculating plasmid.

D2 does not describe either all the claimed steps or their sequence. Nor does D2 teach that the oligonucleotides are synthesised in a restriction/ligation cycle or that the oligonucleotides so produced are used in the parallel method.

.../..



(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: I, II, V

- 4.3 Since Claim 1 enjoys the priority date of the priority document, D6 is not regarded as prior art.
- 4.4 None of the documents D3 to D5 discloses a method according to Claims 1 14. Similarly, D6 does not disclose a method according to Claim 5.

None of the documents D3 to D6 discloses a kit or a device that uses such a kit according to Claims 15 and 16. Consequently, these claims appear to be novel over the available prior art.

## 4) Inventive step (PCT Article 33(3))

Document D1, which is regarded as the closest prior art, discloses a method for producing oligomeric or polymeric functional elements which are generated according to a given plan by linkage of at least two design elements using a solid phase as a reaction support. The design elements are linked in a predetermined sequence and micro-reaction first steps can be carried out in parallel.

In the stepwise linkage of design elements, each design element is preferably coupled as a reaction partner to a solid phase. If nucleic acids are used, it is advantageous to provide at least one reaction partner with a Class IIS endonuclease identification interface which allows specific linkage of any desired sequences.

.../...



(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: I, II, V

The Class IIS endonuclease identification interface incorporated in the single-strand end to be cut off makes it possible reform a double-stranded nucleic acid element which is bound to the solid phase. The subject matter of Claim 1 differs in that the oligonucleotides produced by an enzymatic ligation/restriction cycle are themselves bound.

The problem to be solved by the present invention was therefore to provide a method which allows fast and efficient synthesis of a nucleotide with the fewest possible ligation steps.

None of the documents D1 to D5, either alone or in any combination, proposes a method wherein a sequential synthesis is combined with a parallel synthesis.

The solution to this problem proposed in Claims 1 - 14 of the present application therefore appears to involve an inventive step.

Document D1 is regarded as the closest prior art for Claim 15. D1 describes the use of parallel-structured design libraries of functional oligomers or polymers (cf. page 8, second paragraph).

The difference between D1 and the claimed kit is that the two different libraries contain oligonucleotides which have recognition sequences for the restriction enzyme that are different from type IIS;

.../...



.





(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: I, II, V

one library contains oligonucleotides which have a modification at one end and which can therefore be coupled to a solid matrix.

Since the non-obvious method described above requires the specific design of the kit, there is no suggestion in documents D1 to D5 to assemble such a kit. The solution to this problem proposed in Claim 15 of the present application therefore appears to involve an inventive step.

The device of Claim 16 appears to be inventive, provided that it is characterized by its essential technical features and is so linked with the invention as to form a single general inventive concept. The device cannot be characterized by the components it uses (e.g., a glass cannot be characterized by its contents).



## **PCT**

2 8 SEP 2001

## INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

PCT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts DV-001 PCT	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)			
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum(Ta	g/Monat/Jahr) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag)			
PCT/DE00/01863	07/06/2000	07/06/1999			
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68					
Anmelder					
Sloning BioTechnology GmbH, et al					
<ol> <li>Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</li> </ol>					
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt	2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 8 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.				
Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).					
Diese Anlagen umfassen insgesamt 5 Blätter.					
3. Dieser Bericht enthält Angaben zu f	Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:				
। ⊠ Grundlage des Berichts					
II 🖾 Priorität					
_		lerische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit			
IV	•				
		der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gen zur Stützung dieser Feststellung			
VI 🗆 Bestimmte angeführte l	Jnterlagen				
VII	nternationaleri Anmeldung				
VIII   Bestimmte Bemerkunge	en zur internationalen Anmeldu	ng			
Datum der Einreichung des Antrags		der Fertigstellung dieses Berichts			
08/01/2001		001			
Name und Postanschrift der mit der internation Prüfung beauftragten Behörde:	nalen vorläufigen Bevollm	ächtigter Bediensteter			
Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656	Pilat, I	D (State of the state of the st			
Fax: +49 89 2399 - 4465	· ·	+49 89 2399 8668			





# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/01863

i. Grui	ndlage	des	Beri	chts
---------	--------	-----	------	------

1.	Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)):  Beschreibung, Seiten:					
	1-3	30	ursprüngliche Fassung			
	Pat	Patentansprüche, Nr.:				
	17-	20	ursprüngliche Fassung			
	1-1	6	mit Telefax vom	13/09/2001		
	Zei	chnungen, Blätter	:			
	1/8	-8/8	ursprüngliche Fassung			
<ol> <li>Hinsichtlich der Sprache: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.</li> <li>Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um</li> </ol>						
		die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).				
<ul> <li>die Sprache der Übersetzung, die für die zist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).</li> </ul>				cke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worder		
3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten <b>Nucleotid- und/oder Aminosäure</b> internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden,						
		in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.				
·			r internationalen Anmeldung	in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.		
		bei der Behörde n	achträglich in schriftlicher Fo	orm eingereicht worden ist.		
		bei der Behörde n	achträglich in computerlesb	arer Form eingereicht worden ist.		
		Die Erklärung, dal	3 das nachträglich eingereic	hte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Idung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.		
			3 die in computerlesbarer Fo entsprechen, wurde vorgele	orm erfassten Informationen dem schriftlichen		





## INTERNATIONALER VORLÄUFIGER **PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/01863

4.	Auf	Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:				
		Beschreibung,	Seiten:			
		Ansprüche,	Nr.:			
		Zeichnungen,	Blatt:			
5.		□ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus de angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).				
(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen;sie sind diesem beizufügen).						cht
6.	Etwaige zusätzliche Bemerkungen:					
II.	Priorität					
1.		☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da folgende angeforderte Unterlagen nicht innerhalb der vorgeschriebenen Frist eingereicht wurden:				
	☐ Abschrift der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.					
		☐ Übersetzung de	r früheren Anr	neldung, deren F	Priorität beansprucht worden ist.	
2.		Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da sich der Prioritätsanspruch als ungültig herausgestellt hat.				
		Zwecke dieses Beric bliche Datum.	hts gilt daher	das obengenann	nte internationale Anmeldedatum als das	
3.	3. Etwaige zusätzliche Bemerkungen: siehe Beiblatt					
٧.	<ul> <li>J. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen T\u00e4tigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erkl\u00e4rungen zur St\u00fctzung dieser Feststellung</li> </ul>					
1.	Fest	Feststellung				
	Neuheit (N)		Ja No	a: Ansprüche ein: Ansprüche	1-16	
Erfinderische Tätigkeit (ET)		•	a: Ansprüche ein: Ansprüche	1-16		
	Gew	verbliche Anwendbark		a: Ansprüche ein: Ansprüche	1-16	

2. Unterlagen und Erklärungen



Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/01863

siehe Beiblatt



### Zu Punkt I

## Grundlage des Berichts

- 1) Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:
  - D1: WO 95 17413 A (EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH; SCHWIENHORST ANDREAS (DE); LINDEMANN BJOER) 29. Juni 1995 (1995-06-29)
  - D2: EUGEN UHLMANN: 'An alternative approach in gene synthesis: use of long selfpriming oligodeoxynucleotides for the construction of double-stranded DNA' GENE, Bd. 71, 15. November 1988 (1988-11-15), Seiten 29-40, XP000941756
  - D3: WO 93 19202 A (US ARMY) 30. September 1993 (1993-09-30)
  - D4: WO 98 10095 A (BRAX GENOMICS LTD ;THOMPSON ANDREW HUGIN (GB); SCHMIDT GUNTER (GB)) 12. März 1998 (1998-03-12)
  - D5: WLODEK MANDECKI ET AL.: 'A totally synthetic plasmid for general cloning, gene expression and mutagenesis in Escherichia coli' GENE, Bd. 94, 28. September 1990 (1990-09-28), Seiten 103-107, XP000941757
  - D6: WO 99 47536 A (BERNAUER ANNETTE) 23. September 1999 (1999-09-23)
  - D7: WO-A-9947536

### 2) Änderungen (Artikel 34 (2) (b) PCT

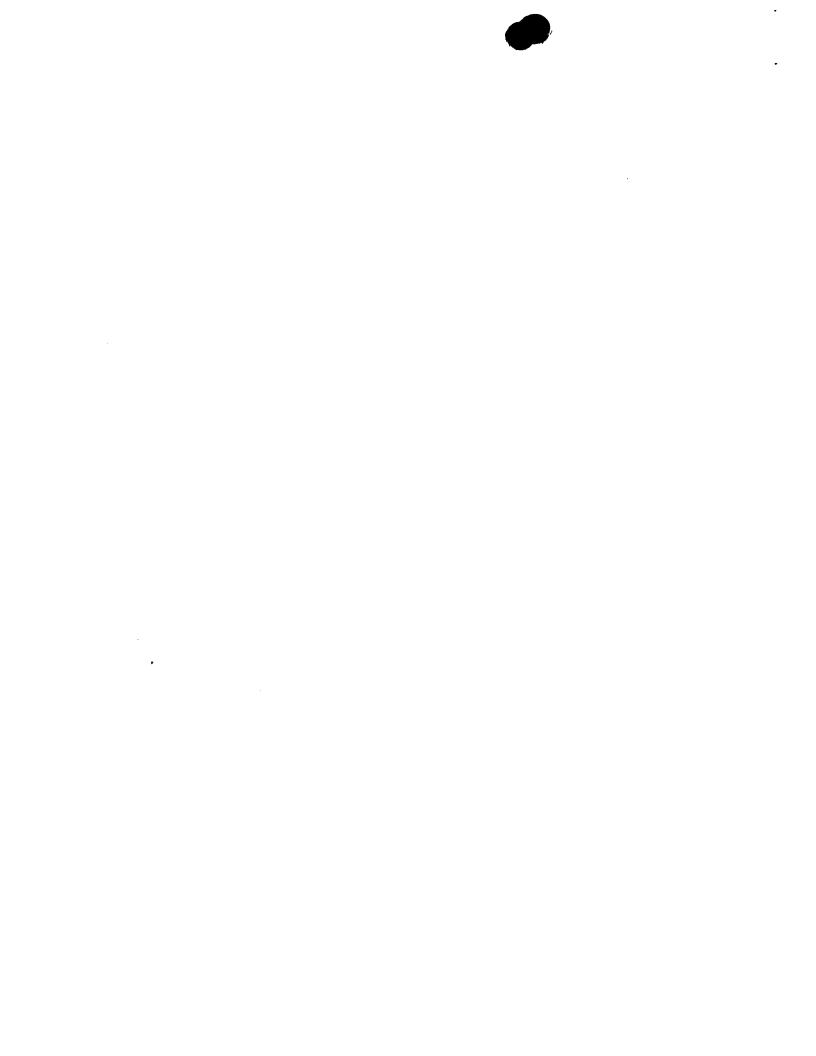
2.1 Die mit Schreiben vom 13.9.01 eingereichten Änderungen scheinen zulässig zu sein. Diese scheinen nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung hinaus zu gehen und genügen deshalb dem Artikel 34 (2) b) PCT.

Basis für den geänderten Anspruch 1 wird in der Anmeldung auf S. 7-8 übergreifender §, S.12 Z.18-21 und S.13 Z.10-18 sowie durch die Abbildungen 1& 14 gestützt.

### Zu Punkt II

### **Priorität**

- 3.1 Das Verfahren laut Anspruch 1 scheint die Priorität zu genießen.
- 3.2 Die beanspruchte Ausführungsart die sich auf ein Oligonukleotid aus Schritt a),





welches einen <u>Teil</u> einer Erkennungssequenz für ein TypIIS Restriktionsenzym enthält, wie in den Ansprüchen 5, 15, 16 beansprucht, ist im Prioritätsdokument nicht vorhanden.

Diese Erweiterungen sind deshalb nicht direkt oder unweigerlich vom Prioritätsdokument zu entnehmen. Infolgedessen ist das P Dokument als Stand der Technik zu betrachten für die Ansprüche 5, 15, 16 und deren abhängigen Ansprüche.

### Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

- 4) Neuheit (Artikel 33 (2) PCT)
- 4.1 Das Verfahren im Anspruch 1 scheint gegenüber D1 neu zu sein. D1 beschreibt weder all die beanspruchten Schritte, noch ihre Abfolge. D1 lehrt auch weder die hergestellten Oligonukleotide im Parallelverfahren zu benutzen, noch daß zwei Typ IIS Restriktionsenzyme eingesetzt werden müssen, um eine Sequenzunabhängige und Orientierungsspezifische Ligation zu erzwingen.
- 4.2 D2 beschreibt die Benutzung eines Oligonukleotid das am 3' Ende selbstkomplementär ist. Diese Oligonukleotide werden durch eine Polymerase Aktivität zu einem Doppelstrang aufgefüllt. Das offene Ende wird durch ein Restriktionsenzym abverdaut und an einem passend komplementär geschnittenen Ende eines Vektors anligiert. Das 3' selbstkomplementäre Ende des anligierten Oligonukleotids kann durch ein Restriktionsenzym abverdaut werden und mit einem weiteren Oligonukleotid anligiert werden oder das komplementäres Ende eines rezirkulierenden Plasmids sein.
  - D2 beschreibt weder all die beanspruchten Schritte, noch ihre Abfolge. D2 lehrt auch nicht die Oligonukleotide in einem Restriktions/Ligations Zyklus zu synthetisieren noch die so hergestellten Oligonukleotiden im Parallelverfahren zu benutzen.
- 4.3 Indem Anspruch 1 das Prioritätsdatum des Prioritätsdokument genießt, ist D6





## INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT

nicht als Stand der Technik anzusehen.

4.4 Keines der Dokumente D3 bis D5 offenbart ein Verfahren gemäß Ansprüche 1-14. Gleichermaßen offenbart auch D6 kein Verfahren gemäß Anspruch 5. Keines der Dokumente D3 bis D6 offenbart ein Kit und eine Vorrichtung die solch einen Kit benutzt gemäß Anspruch 15 und 16. Es scheint deshalb daß diese Ansprüche gegenüber dem vorliegenden Stand der Technik neu sind.

## 4) Erfinderische Tätigkeit (Artikel 33 (3) PCT)

Dokument D1, das als nächstliegender Stand der Technik angesehen wird, offenbart ein Verfahren zur Herstellung oligomerer oder polymerer Funktionselemente, die durch Verknüpfung von mindestens zwei Formenelementen unter Einsatz einer festen Phase als Reaktionsträger, planmäßig generiert werden. Die Formenelemente werden in vorbestimmter Reihenfolge verknüpft und können in parallel geführten Mikro-Reaktionsansätzen durchgeführt werden.

Vorzugsweise wird bei der schrittweisen Verknüpfung der Formenelemente, jeweils ein Formenelement als Reaktionspartner an eine feste Phase gekoppelt. Werden Nukleinsäuren verwendet, so ist es vorteilhaft wenigstens ein Reaktionspartner mit einer Endonukleaseerkennungsschnittstelle der Klasse IIS zu versehen, sodass sie eine gerichtete Verknüpfung von beliebigen Sequenzen erlauben.

Die in dem abzuschneidenden einzelsträngigen Ende eingebaute Endonukleaseerkennungsschnittstelle der Klasse IIS ermöglicht die Herstellung eines wieder doppelsträngigen, an der festen Phase gebundenes Nukleinsäureelements. Der Gegenstand des Anspruchs 1 unterscheidet sich dadurch, daß die durch einen enzymatischen Ligations/Restriktions Zyklus hergestellten Oligonukleotide wiederum ihrerseits verbunden werden. Die vorliegenden Erfindung lag somit die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen welches eine schnelle und effiziente Synthese einer Nukleinsäure bei einer möglichst geringen Anzahl von Ligationsschritten erlaubt. Keines der Dokumente D1 bis D5 schlägt, weder alleine noch in irgendeiner Kombination, ein Verfahren vor, das eine sequentielle Synthese mit einer parallelen Synthese kombiniert werden soll.



.

-



## INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT

1 01/02/01/01/05

Die in Anspruch 1-14 der vorliegenden Anmeldung für diese Aufgabe vorgeschlagene Lösung scheint deshalb auf einer erfinderischen Tätigkeit zu beruhen.

Dokument D1 wird als nächstliegender Stand der Technik angesehen gegenüber Anspruch 15. D1 beschreibt die Verwendung parallel aufgebauter Formen-Bibliotheken funktionaler Oligomere oder Polymere (vgl. S.8, 2§).

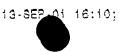
Der Unterschied zwischen D1 und dem beanspruchten Kit liegt darin daß die zwei verschiedenen Bibliotheken Oligonukleotiden enthalten, die hinsichtlich der Erkennungssequenz für die Restriktionsenzyme vom Typ IIS verschieden sind, wobei eine Bibliothek Oligonukleotiden enthält, die über eine Modifikation an einem Ende verfügen und somit an einer festen Matrix koppelbar sind.

Nachdem das oben nicht naheliegende beschriebene Verfahren die spezifische Ausgestaltung des Kits bedingt, gibt es kein Hinweis in den Dokumente D1 bis D5 solch ein Kit zusammenzusetzen. Die in Anspruch 15 der vorliegenden Anmeldung für diese Aufgabe vorgeschlagene Lösung scheint deshalb auf einer erfinderischen Tätigkeit zu beruhen.

Die Vorrichtung des Anspruch 16, scheint erfinderisch zu sein, unter Vorbehalt das diese Vorrichtung durch ihre essentiellen technischen Merkmale characterisiert wird und mit der Erfindung eine einzige allgemeine erfinderische Idee verwirklicht. Die Vorrichtung kann nicht durch ihre benutzten Bestandteile charakterisiert werden (z.B. ein Glas durch sein Inhalt).







## Sloning Bio Technology GmbH PCT/DE00/01863 / S 10002 PCT

## Neue Ansprüche

- 1. Verfahren zur Herstellung eines Nukleinsäuremoleküls umfassend die Schritte
- a) Beroitstellen eines Oligonukleotids, das horgestellt ist durch die folgenden Schritte:
- aa) Kopplung eines Oligonukleotids mit einem Ende an eine feste Matrix, wobei die Kopplung über eine Modifikation erfolgt, und das Oligonukleotid eine Erkennungssequenz für ein Typfis Restriktionsenzym enthält, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet,
- ab) Zugabe eines weiteren, mindestens teilweise doppelsträngigen Oligonukleotids mit einer anderen Erkennungssequenz für ein TypIIS Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, als in Schritt aa), wobei dieses Oligonukleotid nicht an die Matrix binden kann,
- ac) Ligation der Oligonukleotide aus Schritt aa) und ab) in der durch die Blockierung der nicht zu ligierenden Enden festgelegten Orientierung,
- ad) Entfernen nicht verbrauchter Reaktanden sowie Enzyme,
- ae) Spaltung des Ligationsprodukts aus Schritt ac) mit einem TypIIS Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung in der Nukleinsäuresequenz des Oligonukleotids aus Schritt ab) stattfindet,
- af) Abtrennen des Reaktionsgemisches vom in Schritt ae) erhaltenen verlängerten Oligonukleotid aus Schritt aa),
- ag) mindestens einmaliges Wiederholen der Schritte ab) bis af),
- b) Bereitstellen eines weiteren Oligonukleetids, das hergestellt ist durch die Schritte:





0895155641항;

ba) Kopplung eines Oligonuklcotids mit einem Ende an eine feste Matrix, wobei die Kopplung über eine Modifikation erfolgt, und das Oligonukleotid eine Erkennungssequenz für ein TypIIS Restriktionsenzym enthält, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet,

2

- Zugabe cincs weiteren, mindestens teilweise doppelsträngigen Oligonukleotids mit bb) einer anderen Erkennungssequenz für ein Typlis Restriktionsenzym, welches außerhalb seine Erkennungssequenz schneidet, als in Schritt ba), wobei dieses Oligonukleotid nicht an die Matrix binden kann,
- bc) Ligation der Oligonukleotide aus Schritt ba) und bb) in der durch die Blockierung der nicht zu ligierenden Enden festgelegten Orienticrung,
- bd) Entfernen nicht verbrauchter Reaktanden sowie Enzyme,
- Spaltung des Ligationsproduktes aus Schritt be) mit einem TypIIS Restriktionsenzym, he) welches außerhalb seine Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung im Oligonuklcotid in Schritt bb) stattfindet,
- Abtrennen des so verlängerten Nukleinsäuremoleküls vom Reaktionsgemisch, bf)
- mindestens einmaliges Wiederholen der Schritte bb) bis bf), wobei im Anschluss an bg) die letzte Ligation in Schritt bc) und Entfernen nicht verbrauchter Reaktanden sowie Enzyme das Ligationspordukt mit einem TypIIS Restriktionsenzym geschnitten wird, wobei die Spaltung in Oligonukleotid in Schritt ba) stattfindet,
- Ligation der Oligonukleotide aus Schritt a) und b) in der durch die Blockierung der c) nicht zu ligierenden Enden festgelegten Orientierung,
- d) Entsernen nicht verbrauchter Reaktanden sowie Enzyme,



.



- 3
- e) Spaltung des Ligationsproduktes aus Schritt c) mit einem TypIIS Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung im Oligonukleotid aus Schritt a) oder b) stattfindet,
- f) Abtrennen des so verlängerten Nukleinsäuremoleküls vom Reaktionsgemisch.
- 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das in Schritt ab) oder bb) eingesetzte Oligonukleotid ein durch das Verfahren nach Anspruch 1 hergestelltes Nukleinsäuremolekül ist.
- 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei nach Schritt ac), bc) oder c) als Schritt ac)', bc)' oder c)' eine Exonuklease- und/oder Phosphatase-Reaktion durchgeführt wird.
- 4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das Reaktionsgemisch des Schrittes ac)', bc)' oder c)' nach der Reaktion entfernt wird.
- 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Oligonukleotid aus Schritt a), aa) oder ba) an dem Ende, welches nicht an die Matrix gekoppelt ist, einen Teil einer Erkennungssequenz für ein Typlis Restriktionsenzym enthält, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, und der andere Teil der Erkennungssequenz für dieses Restriktionsenzym vom Oligonukleotid aus Schritt ab), bb) oder b) stammt.
- 6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, wobei die Modifikation ein Biotinrest, ein Digoxigeninrest, ein Fluoresceinisothiocyanatrest, eine Aminoverbindung oder ein Succinylester ist.
- 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Oligonukleotid aus Schritt aa), ba) oder a) und/oder ab), bb) oder b) über einen Loop verfügt.
- 8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das Oligonukleotid aus Schritt aa), ba) oder a) über eine Modifikation im Loopbereich an die feste Matrix gekoppelt ist.

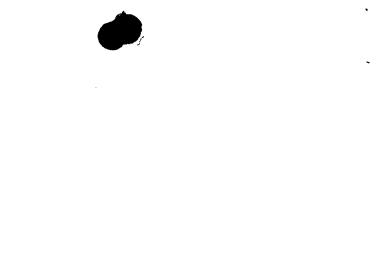


·



4

- 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die feste Matrix ein Kügelchen (bead), vorzugsweise aus Glas oder Polystyrol, ein Objektträger, ein DNA Chip, die Vertiefung einer Mikrotiterplatte (well) oder ein Reaktionsröhrehen ist.
- 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die feste Matrix einen Streptavidirrest, einen anti-Digoxigenin-Antikörper oder anti-Fluoresceinisothiocyanat-Antikörper umfasst.
- 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Oligonukleotide aus Schritt aa), ba) oder a) und ab), bb) oder b) an ihren zu ligierenden Enden über zueinander komplementäre Einzelstrangüberhänge verfügen.
- 12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die Einzelstrangüberhänge 1, 2, 3, 4 oder 5 Nukleotide lang sind.
- 13. Verfahren nach Anspruch I bis 12, wobei die verschiedenen TypIIS Restriktionsendonukleasen durch analog schneidende Ribozyme ersetzt werden.
- 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei das Oligonukleotid in Schritt ab), bb) oder b) ein PCR-Produkt, ein Plasmidvektor, eine Phagen- oder Virus-DNA, ein künstliches Chromosom oder eine weitere synthetische DNA ist.
- 15. Kit zur Herstellung einer Nukleinsäuresequenz nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, umfassend
  - a) eine Bibliothek von 1 bis 1.048.576 verschiedenen Oligonukleotiden enthält, wobei die Oligonukleotide über eine Modifikation an einem Ende an eine feste Matrix koppelbar sind und das Oligonukleotid eine Erkennungssequenz oder einen Teil der Erkennungssequenz für ein TypIIS Restriktionsenzym enthält, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet,
  - b) eine weitere Bibliothek von 4 bis 1.048.576 verschiedenen Oligonukleotiden enthält, wobei jedes der Oligonukleotide eine Erkennungssequenz für ein TypIIS Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, enthält, dass von dem Typ IIS Restriktionsenzym aus aa), ba) oder





a) verschieden ist, und gegebenensalls den anderen Teil der Erkennungssequenz des Restriktionsenzyms aus Schritt aa) ba) oder a) enthält,

13-SEP-01 16:11;

c) eine feste Matrix,

.BS.: BOHMANN & LOOSEN;

- d) Reservoire der für die Herstellung des Nukleinsäuremolektils benötigten Enzyme und/oder anderer Reagenzien.
- 16. Vorrichtung zur automatisierten Herstellung eines Nukleinsäuremoleküls nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche I bis 14, dadurch charakterisiert, dass sie
  - a) eine Bibliothek von 1 bis 1.048.576 verschiedenen Oligonukleotiden enthält, wobei die Oligonukleotide über eine Modifikation an einem Ende an eine seste Matrix koppelbar sind und das Oligonukleotid eine Erkennungssequenz oder einen Teil der Erkennungssequenz für ein Typfis Restriktionsenzym enthält, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet,
  - eine weitere Bibliothek von 4 bis 1.048.576 verschiedenen Oligonukleotiden enthält, wobei jedes der Oligonukleotide eine Erkennungssequenz für ein TypIIS Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, enthält, dass von dem Typ IIS Restriktionsenzym aus aa), ba) oder a) verschieden ist, und gegebenenfalls den anderen Teil der Erkennungssequenz des Restriktionsenzyms aus Schritt aa), ba) oder a) enthält,
  - c) eine feste Matrix,
  - d) Reservoire der für die Herstellung des Nukleinsäuremoleküls benötigten Enzyme und/oder anderer Reagenzien, und
  - ein Steuerungsprogramm, das einzelne Oligonukleotide aus aa), ba) oder a) und ab), bb) oder b) identifizieren, mit der festen Matrix aus ac), bc) oder c) und den benötigten Enzymen und/oder anderen Reagenzien aus ad), bd) oder d) zusammenbringen und die Abfolge von Herstellungsschritten bestimmen und durchführen kann.

